

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

Determinación del papel de la proteína quinasa MNK1b en cáncer de mama y desarrollo de aptámeros como posibles herramientas para su regulación

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Eva Marina García Recio

Directores

M^a Elena Martín Palma
Víctor González Muñoz

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



DETERMINACIÓN DEL PAPEL DE LA PROTEÍNA QUINASA MNK1b EN CÁNCER DE MAMA Y DESARROLLO DE APTÁMEROS COMO POSIBLES HERRAMIENTAS PARA SU REGULACIÓN

TESIS DOCTORAL

EVA MARINA GARCÍA RECIO

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



DETERMINACIÓN DEL PAPEL DE LA PROTEÍNA QUINASA MNK1b EN CÁNCER DE MAMA Y DESARROLLO DE APTÁMEROS COMO POSIBLES HERRAMIENTAS PARA SU REGULACIÓN

Memoria para optar al Grado de Doctor
presentada por

Eva Marina García Recio

Directores

Dra. María Elena Martín Palma
Dr. Víctor Manuel González Muñoz

Madrid, 2014

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el Servicio de Bioquímica del Departamento de Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid (durante los años 2009-2013). Su desarrollo ha sido posible gracias a las siguientes ayudas a proyectos de investigación y contratos:

PROYECTOS

2009. Estudio de la implicación de los factores de iniciación de la traducción en la apoptosis inducida por hipoxia. Posible aplicación en la identificación de marcadores de la encefalopatía hipóxico-isquémica. Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS06/0289)

2010-2013. Papel de Mnk1b en la tumorigénesis de tumores de mama y colorectales. Fundación Mutua Madrileña (AP76332010)

2011-2013. Caracterización molecular y funcional de la proteína quinasa Mnk1b.MICINN (SAF2010-21663)

CONTRATOS

2010-2011. Contrato asociado al proyecto Microsistemas ópticos sensores resonantes. Comunidad Autónoma de Madrid (S2009/TIC1476)

2012-2013. Contrato asociado al proyecto Desarrollo y validación clínica de un Kit para diagnosticar la evolución de la masa absortiva intestinal, empleando tecnología innovadora basada en aptámeros selectivos de la proteína APO A-IV. MICINN (IPT-2011-1057-010000)

Parte de los resultados de esta tesis están en proceso de ser patentados.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	5
1. LAS MNKS: PROTEÍNAS QUINASAS QUE INTERACCIONAN CON MAPK 7	
1.1 FAMILIA DE LAS MNKS	7
1.2 SUSTRATOS DE LAS MNKS	11
1.2.1 Factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E).....	11
1.2.2 Factor de iniciación eucariótico 4G (eIF4G).....	15
1.2.3. Proteínas que unen elementos ricos en AU (AREs): hnRNP A1 y PSF	16
1.2.4. Fosfolipasa A2 citoplasmática: cPLA2.....	17
1.2.5. Sprouty: Spry2	17
1.3 IMPORTANCIA DEL eIF4E EN CÁNCER	17
1.4 OTRAS FUNCIONES CELULARES DE LAS MNKS	23
2. BIOLOGÍA MOLECULAR EN CÁNCER DE MAMA	24
3. APTÁMEROS.....	26
OBJETIVOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
1. TUMORES DE MAMA	41
2. CULTIVOS CELULARES	45
2.1 LINEAS CELULARES EUCARIOTAS.....	45
2.2 TRATAMIENTOS	46
2.3 TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE CÉLULAS.....	47
2.4 TRANSFECCIÓN ESTABLE DE CÉLULAS.....	47
2.5 OBTENCIÓN DE LISADOS CELULARES	48
2.6 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR.....	48
2.6.1 Determinación de la viabilidad por exclusión de azul tripán	48
2.6.2 Determinación de la reducción de las sales de tetrazolio (MTT)	49
2.7 ENSAYOS DE FORMACIÓN DE COLONIAS	49
2.8 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DEL mRNA.....	50

2.9 OTROS ENSAYOS.....	51
2.9.1 Ensayos de afinidad de eIF4G y 4E-BP1 por el eIF4E.....	51
2.9.2 Valoración de la síntesis de proteínas	52
3. MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	52
3.1 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	52
3.2 TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS E INMUNODETECCIÓN (<i>Western blot</i>).....	53
4. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE MNKS RECOMBINANTES	57
4.1 PURIFICACIÓN DE HIS-MNK1b.....	57
4.2 PURIFICACIÓN DE GST-MNKs	57
5. SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE APTÁMEROS.....	60
5.1 SELECCIÓN <i>IN VITRO</i> (SELEX)	60
5.2 CLONAJE DE LOS APTÁMEROS Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	62
5.3 MARCAJE DE APTÁMEROS Y TRATAMIENTO CON EXONUCLEASA	63
5.4 ENSAYO ENZIMÁTICO EN PLACA CON APTÁMEROS (ELONA).....	63
5.5 ANÁLISIS DE LOS COMPLEJOS APTÁMERO-DIANA POR PCR A TIEMPO REAL..	64
5.6 MEDIDA DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE LOS APTÁMEROS.....	65
6. ENSAYOS DE ACTIVIDAD MNK QUINASA	66
7. INMUNOCITOQUÍMICA Y APTACITOQUÍMICA.....	68
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	69
9. MATERIALES.....	69
RESULTADOS.....	71
1. PAPEL DE MNK1a y MNK1b EN LA PROGRESIÓN TUMORAL EN CÁNCER DE MAMA	73
1.1 EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS MNK1a Y MNK1b EN TUMORES DE MAMA...	73
1.2 ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS PROTEÍNAS MNK1a Y MNK1b EN LÍNEAS CELULARES DE MAMA	78
1.2.1 Expresión de MNK1a y MNK1b y fosforilación del eIF4E	78
1.2.2 Estudio de las vías de señalización celular	81

1.2.3 Análisis del papel de MNK1 en la viabilidad de las líneas celulares de mama.....	84
1.2.4 Análisis del papel de MNK1 en la capacidad clonogénica de las líneas celulares de mama.....	89
2. SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE APTÁMEROS FRENTE A MNK1b.....	91
2.1 SELECCIÓN <i>IN VITRO</i> , CLONAJE E IDENTIFICACIÓN DE APTÁMEROS FRENTE A MNK1b.....	91
2.2 IDENTIFICACIÓN DE APTÁMEROS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	94
2.2.1 Identificación de aptámeros con actividad biológica <i>in vitro</i>	94
2.2.2 Identificación de aptámeros con actividad biológica <i>in vivo</i>	95
2.3 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LOS APTÁMEROS SELECCIONADOS.....	96
2.3.1 Análisis bioinformático de las estructuras secundarias de los aptámeros	96
2.3.2 Caracterización de la interacción de los aptámeros con MNK1 mediante ELONA.....	98
2.3.3 Utilización de los aptámeros para la detección de MNK1a/b en citoquímica	100
2.4 EFECTOS DE LOS APTÁMEROS SELECCIONADOS EN CÉLULAS MDA-MB-231	103
DISCUSIÓN.....	109
CONCLUSIONES.....	129
BIBLIOGRAFÍA	133
RESUMEN EN INGLÉS	153

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1	Esquema general de las MNKs humanas y secuencias de MNK1a/b	9
Figura 2	Modelo del mecanismo de acción de los factores eIF4 implicados en la traducción de mRNAs dependientes de la estructura cap	13
Figura 3	Funciones del eIF4E en la modulación de la expresión génica	19
Figura 4	La regulación del eIF4E supone la convergencia de dos vías de señalización celular	22
Figura 5	Selección de aptámeros <i>in vitro</i> mediante la tecnología SELEX	28
Figura 6	Representación esquemática de los aptámeros y sus posibles estructuras secundarias	29
Figura 7	Procesamiento de las muestras tumorales de mama	41
Figura 8	Secuencias de MNK1a y MNK1b	44
Figura 9	Purificaciones de MNKs recombinantes	59
Figura 10	Esquema general del proceso SELEX	61
Figura 11	Expresión y niveles del mRNA de MNK1a y MNK1b en tumores de mama	76
Figura 12	Expresión y fosforilación del eIF4E en tumores de mama	78
Figura 13	Expresión y niveles de los mRNAs de MNK1a y MNK1b en líneas celulares de mama	79
Figura 14	Expresión y fosforilación del eIF4E en líneas celulares de mama	80
Figura 15	Vías de señalización celular que regulan la fosforilación del eIF4E	81
Figura 16	Análisis de las vías de señalización celular en líneas celulares de mama	82

Figura 17	Complejos 4E-BP1/eIF4E y niveles de 4E-BP1 en líneas celulares de mama	83
Figura 18	Contaje y actividad MTT de las líneas celulares de mama	84
Figura 19	Efecto de los inhibidores sobre la actividad MTT	85
Figura 20	Efecto de los inhibidores sobre la fosforilación del eIF4E	86
Figura 21	Efecto del CGP57380 sobre la actividad MTT de MDA-MB-231	87
Figura 22	Caracterización de las líneas MDA-MB-231 estables	88
Figura 23	Efecto del CGP57380 en la actividad MTT de las células MDA-MB-231 estables	89
Figura 24	Efecto del CGP57380 en la formación de colonias de las células MCF7 y MDA-MB-231	90
Figura 25	Estudio de la evolución de la selección mediante ELONA	91
Figura 26	Análisis de la afinidad de las cadenas F y R de los aptámeros	93
Figura 27	Efecto de los aptámeros sobre la actividad quinasa de MNK1a y MNK1b <i>in vitro</i>	94
Figura 28	Efecto de los aptámeros en la fosforilación del eIF4E y en la actividad MTT en HEK293T	96
Figura 29	Estructuras secundarias y G-cuádruplex	97
Figura 30	Caracterización de la interacción de los aptámeros con MNK1 mediante ELONA	99
Figura 31	Inmunocitoquímica en células MDA-MB-231 estables	101
Figura 32	Aptacitoquímica en células MDA-MB-231 MNK1a	101
Figura 33	Aptacitoquímica en células MDA-MB-231 MNK1b (A) y en células MDA-MB-231 transfectadas con MNK1b (B)	102
Figura 34	Estudio de la vida media de los aptámeros en las células MDA-MB-231	103
Figura 35	Efecto de los aptámeros sobre la actividad MTT de las células MDA-MB-231	104

Figura 36	Efecto de los aptámeros sobre la capacidad clonogénica (A) y la fosforilación del eIF4E (B)	105
Figura 37	Efecto de los aptámeros sobre la fosforilación del eIF4E en células MDA-MB-231	106
Figura 38	Efecto de la supresión de la expresión de MNK1/2 sobre la fosforilación del eIF4E	107
Figura 39	Vías de señalización celular en MCF7 (A), MDA-MB-231 (B) y BT474 (C)	118
Figura 40	Esquema de MNK1a, MNK1b, MNK1a Δ 77 y MNK1 Δ Ct y el posible lugar de interacción con los aptámeros	126
Tabla 1	Características de las isoformas de las MNKs humanas	15
Tabla 2	Características de los subtipos moleculares de cáncer de mama	26
Tabla 3	Diferencias entre los aptámeros y los anticuerpos	31
Tabla 4	Oligonucleótidos utilizados en qPCR	42
Tabla 5	Relación de anticuerpos primarios utilizados en la determinación de proteínas	54
Tabla 6	Relación de anticuerpos secundarios utilizados en la determinación de proteínas	55
Tabla 7	Muestras estudiadas de tumores de mama	74
Tabla 8	Resumen de resultados obtenidos mediante ELONA y qPCR con los aptámeros	93

ABREVIATURAS

4E-BPs	Proteínas de unión a eIF4E
Abs	Absorbancia
AKT o PKB	Proteína quinasa B
ARE	Secuencia rica en AU (<i>AU-Rich Element</i>)
ATP	Adenosin trifosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
Cap	Ácido 7-metilguanílico en el extremo 5' del mRNA
cDNA	DNA copia
Ci	Curios (medida de radiactividad)
cPLA2	Fosfolipasa A2 citoplasmática
cpm	Cuentas por minuto
C-terminal	Extremo carboxilo terminal
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
eIF3	Factor de iniciación eucariota 3
eIF4A	Factor de iniciación eucariótico 4A
eIF4B	Factor de iniciación eucariótico 4B
eIF4E	Factor de iniciación eucariótico 4E
eIF4EP	Factor de iniciación eucariótico 4E fosforilado
eIF4G	Factor de iniciación eucariótico 4G
eIFs	Factores de iniciación eucariotas
ELISA	Inmunoensayo enzimático en placa
ELONA	Ensayo enzimático en placa con aptámeros
ER	Receptor de estrógenos
ERK1/2	Quinasa regulada a través de señalización extracelular

Abreviaturas

GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDP	Guanosina 5' difosfato
GST	Glutation transferasa
GTP	Guanosina 5' trifosfato
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
hnRNP	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear
ICQ	Inmunocitoquímica
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kDa	kilodalton
LA	Luminal A
LB	Luminal B
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEF	Fibroblastos embrionarios de ratón
MEK	Quinasa activada por mitógenos/MAP quinasa de ERK
MK5	Proteína quinasa 5 activada por MAPK
MNK1/2	Proteína quinasa de interacción con MAPK
MNK1bSR	Región específica de MNK1b
mRNA	RNA mensajero
MSK	Proteína quinasa activada por mitógenos y estrés
mTOR	Proteína quinasa diana de rapamicina en mamíferos
mTORC1	Complejo 1 de mTOR
MTT	Metiltiazol tetrazolio
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) (forma reducida)
NBT	Azul de nitrotetrazolio/x-fosfato
NES	Señal de exportación nuclear
NLS	Señal de localización nuclear
N-terminal	Extremo amino terminal
ODC	Ornitina descarboxilasa
PABP	Proteína de unión a la cola de poli adeninas
PBS	Tampón fosfato salino

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKD1	Quinasa dependiente de 3' fosoinositol 1
PGK	Fosfoglicerato quinasa
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PR	Receptor de progesterona
PSF	Proteína de unión al tramo de polipirimidina
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
qPCR	PCR a tiempo real
RSK	p90S6 quinasa
S6K	Proteína quinasa de la proteína ribosomal S6
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SELEX	Enriquecimiento exponencial por evolución sistemática de ligandos
SEM	Error estándar de la media
siRNA	RNA de interferencia
Spry	Proteína sprouty
TCA	Ácido tricloroacético
TN	Triple negativo
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
U.A.	Unidades arbitrarias
UTR	Región no codificante del mRNA
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular

INTRODUCCIÓN

1. LAS MNKS: PROTEÍNAS QUINASAS QUE INTERACCIONAN CON MAPK

1.1 FAMILIA DE LAS MNKS

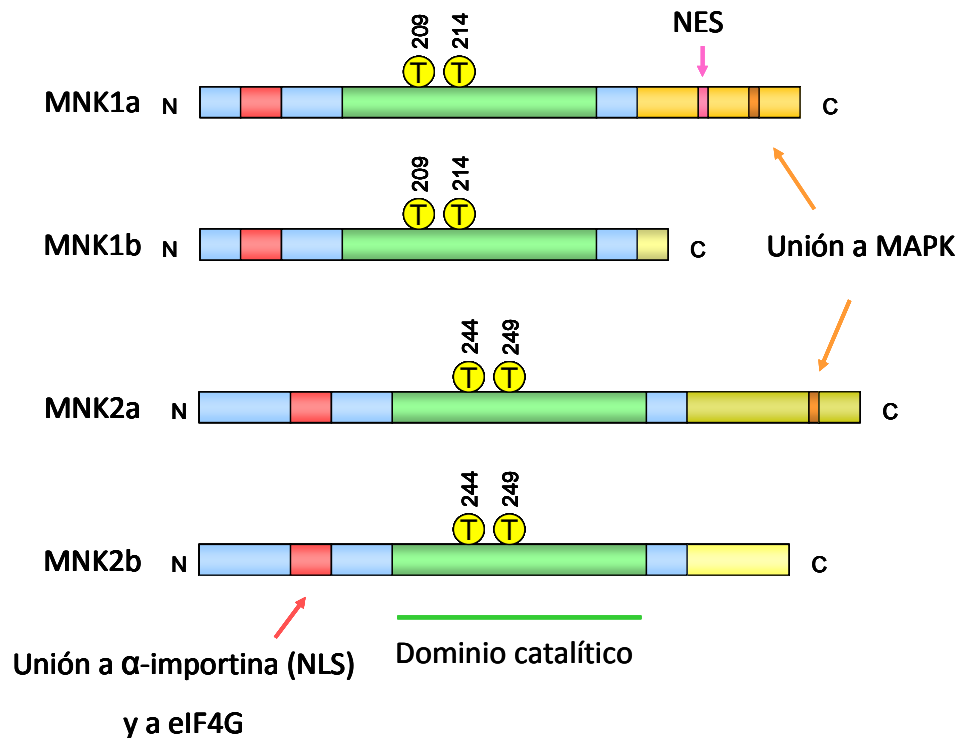
En 1997, dos equipos de investigación independientes descubrieron las MNKS (MNK1 y MNK2). Uno de ellos, utilizando el sistema de doble híbrido en levaduras para identificar proteínas de unión a la quinasa regulada a través de señalización extracelular 2 (ERK2), identificó a MNK1 y MNK2 de ratón como una subfamilia de Ser/Thr quinasas, y determinó que MNK1 interacciona con ERK2 y p38 MAPK mientras que MNK2 interacciona con ERK2. Además, los autores demostraron que MNK1 se activa por agentes que estimulan a ERK (suero, ésteres de forbol) y a p38 MAPK α/β (hiperosmolaridad, radiación UV-C o citoquinas proinflamatorias) (Waskiewicz y col., 1997). El otro grupo de investigadores identificó a la MNK1 humana mediante un estudio utilizando librerías de expresión en bacterias para buscar sustratos de ERK1. Estos estudios establecieron que la MNK1 humana es fosforilada por ERK y por p38 MAPK α/β pero no por la proteína quinasa activada por mitógenos 8 (JNK1 o MAPK8) (Fukunaga y Hunter, 1997).

Los dominios catalíticos de MNK1 y MNK2 presentan aproximadamente un 70% de identidad de secuencia (Roux y Blenis, 2004). Todas las MNKS, tanto de ratón como de humano, contienen un dominio catalítico conservado donde hay dos residuos de Thr (en humanos, residuos 209 y 214 en MNK1 y 244 y 249 en MNK2) que conforman el bucle de activación, el cual es importante para la actividad de estas quinasas. Las MNKS tienen en común con otras proteínas quinasas, como la proteína quinasa 2 activada por MAPK (MK2), la proteína quinasa 3 activada por MAPK (pK3 o MK3), la proteína quinasa 5 activada por MAPK (MK5), la proteína p90S6 quinasa (RSK) y la proteína quinasa activada por mitógenos y estrés (MSK), que en el bucle de activación del dominio catalítico tienen treoninas seguidas de prolina como residuos fosforilables, siendo así sustratos potenciales de la fosforilación por las MAPK. Sin embargo, los dominios catalíticos de las MNKS, a diferencia de otras quinasas, presentan ciertas particularidades, entre las que destaca la presencia del motivo DFD

(Asp-Phe-Asp) en el subdominio VII en lugar de DFG (Asp-Phe-Gly). Además, los dominios catalíticos de MNK1 y MNK2 contienen 2 insertos, uno de ellos localizado entre el motivo DFD y el bucle de activación y el otro junto al motivo APE (Ala-Pro-Glu) en el subdominio VIII. Estas características también se encuentran en la quinasa LK6, que es una proteína de *Drosophila melanogaster* muy cercana a las MNKs (Buxade y col., 2008b). Los estudios de las estructuras tridimensionales de los dominios catalíticos de MNK1 y MNK2 expresadas en bacterias indican que el bucle de activación de MNK2 muestra una inusual conformación abierta y el motivo DFD interfiere en la unión a ATP. Sin embargo, el bucle de activación de MNK1 parece tener un módulo autoinhibitorio porque la conformación que adquiere impide la unión a ATP (Jauch y col., 2006; Jauch y col., 2005).

Existen dos genes que codifican para las MNKs, *MNK1* y *MNK2*. En ratón, estos genes dan lugar a dos proteínas, MNK1 y MNK2. Sin embargo, en humanos, cada uno de estos genes da lugar a dos isoformas distintas (MNK1a, MNK1b y MNK2a, MNK2b), como consecuencia de que la expresión de cada uno de ellos origina dos mRNAs por procesamiento alternativo. Cada par de proteínas procedentes del mismo gen (MNK1a y MNK1b; MNK2a y MNK2b) son idénticas en su región N-terminal y sus dominios catalíticos pero poseen distintas regiones C-terminales, de manera que las isoformas “a” son más largas que las “b” (**Figura 1A**). Las MNKs inicialmente descritas son las formas largas, MNK1a y MNK2a. Ambas presentan en la zona C-terminal un dominio de unión a las MAPK, de secuencia LARRR en MNK1 y LAQRR en MNK2. MNK2b fue identificada como proteína de unión al receptor de estrógenos β (ER β) (Slentz-Kesler y col., 2000). MNK1b fue identificada en 2004 al clonar MNK1 a partir del RNA de células HL-60 (O'Loghlen y col., 2004a). Esta proteína ha perdido el exón 12 por procesamiento alternativo, lo que produce un cambio en el marco de lectura generándose un codón de parada que hace que se forme una proteína con un extremo C-terminal distinto. De esta manera, MNK1b pierde 89 aminoácidos (336-424), los cuales son reemplazados por 12 aminoácidos distintos (336-347), a los que se denomina región específica de MNK1b (MNK1bSR) (O'Loghlen y col., 2007) (**Figura 1B**).

A



B

NLS

MNK1a	1	MVSSQKLEKPIEMGSSEPLPIADGDRRRKKKRRRGRATDSLPGKFEDMYKLTSELLGEGAY
MNK1b	1	MVSSQKLEKPIEMGSSEPLPIADGDRRRKKKRRRGRATDSLPGKFEDMYKLTSELLGEGAY
MNK1a	61	AKVQGAVSLQNGKEYAVKIIKQAGHSRSRVFREVETLYQCQGNKNILELIEFFEDDTRF
MNK1b	61	AKVQGAVSLQNGKEYAVKIIKQAGHSRSRVFREVETLYQCQGNKNILELIEFFEDDTRF
MNK1a	121	YLVFEKLQGGSI LAHIQKQKHFNEREASRVVRDVAAALDFLHTKGIAHRDLKPENILCES
MNK1b	121	YLVFEKLQGGSI LAHIQKQKHFNEREASRVVRDVAAALDFLHTKGIAHRDLKPENILCES
MNK1a	181	PEKVSVPKICDFDLGSGMKLNNSCTPIT T PELT T PCGSAEYMAPEVVEVFTDQATFYDKR
MNK1b	181	PEKVSVPKICDFDLGSGMKLNNSCTPIT T PELT T PCGSAEYMAPEVVEVFTDQATFYDKR
MNK1a	241	CDLWSLGVVLYIMLSGYPPFVGHCADCGWDRGEVCRVCQNKLFESI QEGKYEFPDKDWA
MNK1b	241	CDLWSLGVVLYIMLSGYPPFVGHCADCGWDRGEVCRVCQNKLFESI QEGKYEFPDKDWA
MNK1a	301	HISSEAKDLISKLLVRDAKQRLSAAQVLQHPWVG QAPEKGLPTPQ VLQRNSSTMDLTFLF
MNK1b	301	HISSEAKDLISKLLVRDAKQRLSAAQVLQHPWVG EQQHNGPDALRS
		NES
MNK1a	361	AAEAIALNRQLSQHEENELAEPEALADGLICSMKLS FPCKSR LARRR AL AQAGRGEDRSP
MNK1b	361	
MNK1a	421	PTAL
MNK1b	421	

Figura 1. Esquema general de las MNKs humanas y secuencias de MNK1a/b. (A) Todas las MNKs presentan una secuencia de localización nuclear (NLS) y las treoninas del dominio catalítico, mientras que sólo MNK1a tiene la secuencia de exportación nuclear (NES), y solamente MNK1a y MNK2a poseen el dominio de unión a MAPK. (B) Secuencias de MNK1a y MNK1b en las cuales se señalan los 12 últimos aminoácidos de MNK1b y los correspondientes de MNK1a (letra en negrita), los sitios de fosforilación (en rojo), el dominio de unión a las MAPK (letra cursiva y en negrita) y los dominios de localización (NLS) y exportación nuclear (NES) (en cajas).

Las cuatro isoformas contienen en su extremo N-terminal una región polibásica que es la zona de unión al factor de iniciación eucariótico 4G (eIF4G), proteína de anclaje a cuyo extremo C-terminal se unen las MNKs para fosforilar eficientemente al factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E) (Pyronnet y col., 1999). Además, esta región es una secuencia de localización nuclear (NLS) porque también se une a la α -importina, una carioferina implicada en el transporte de proteínas al núcleo celular, aunque los residuos de esta región que se requieren para la unión a la α -importina y al eIF4G no son los mismos (Parra-Palau y col., 2003). MNK1a también posee en la región C-terminal una secuencia de exportación nuclear (NES), lo que convierte a MNK1a en citoplasmática (Parra-Palau y col., 2003). MNK1b pierde esta secuencia y, en consecuencia, su localización puede ser tanto citoplasmática como nuclear. Aunque MNK2a y MNK2b tampoco tienen secuencia NES, sólo MNK2b se encuentra principalmente en el núcleo, mientras que MNK2a es citoplasmática. Este comportamiento puede deberse a que el extremo C-terminal de MNK2a podría interferir en la unión de la región polibásica (NLS) con la α -importina impidiendo su entrada al núcleo (Scheper y col., 2003).

MNK1 en ratón se expresa en todos los tejidos adultos y MNK2 también, con excepción del cerebro donde los niveles se encuentran muy reducidos. La expresión de ambas proteínas es especialmente abundante en músculo esquelético en comparación con el resto de tejidos (Waskiewicz y col., 1997). En humanos, MNK1a se expresa más en corazón, placenta, hígado y páncreas respecto a cerebro, pulmón, músculo esquelético y riñón. MNK1b se expresa de forma similar en todos los tejidos estudiados excepto en músculo esquelético, donde los niveles son bajos, y en páncreas, donde la expresión tanto de MNK1a como de MNK1b es mayor (O'Loughlen y col., 2004a).

1.2 SUSTRATOS DE LAS MNKS

1.2.1 Factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E)

El eIF4E es el primer sustrato de las MNKS que se identificó, mediante ensayos de actividad quinasa *in vitro* (Waskiewicz y col., 1997). Este factor se une específicamente al cap (una estructura m⁷GpppX localizada en el extremo 5' del mRNA en eucariotas), formando parte del complejo eIF4F reclutando así al ribosoma y siendo clave en la regulación de la iniciación de la traducción dependiente de cap (Gingras y col., 1999). En eucariotas superiores, el eIF4F está formado por tres factores: eIF4E, eIF4A, que es una RNA helicasa dependiente de ATP, y eIF4G, que es una proteína de anclaje (**Figura 2**). Se ha demostrado que el eIF4E se fosforila fisiológicamente en la Ser 209 después del tratamiento de las células con factores de crecimiento, hormonas y mitógenos (Flynn y Proud, 1995; Joshi y col., 1995; Makkinje y col., 1995). También se ha comprobado que la inhibición de las vías de señalización celular de ERK1/2 o p38 MAPK reduce la fosforilación del eIF4E (Wang y col., 1998). Estas correlaciones establecen que las MNKS presentan actividad eIF4E quinasa *in vivo*, lo cual ha sido confirmado por el hecho de que el eIF4E se encuentra completamente desfosforilado en ratones *knock-out* para MNK1 y MNK2, que además no presentan ninguna consecuencia fenotípica aparente (Ueda y col., 2004).

La regulación del eIF4E es muy importante por ser un factor que está presente en la célula a una concentración limitante (0.01-0.2 moléculas por ribosoma), comparada con la de otros factores de iniciación eucariotas (eIFs) (0.3-0.5 moléculas por ribosoma) (Duncan y col., 1987). La actividad del eIF4E se regula por dos mecanismos diferentes: fosforilación/desfosforilación o disponibilidad del eIF4E para participar en la iniciación. Aunque hay muchos estudios sobre el papel de la fosforilación del eIF4E, aún hoy no se conoce claramente cuál es su significado biológico. Se ha demostrado que la fosforilación del eIF4E disminuye su afinidad por el cap del mRNA (Scheper y col., 2002) y se han propuesto distintos modelos para explicar este efecto (O'Loughlen y col., 2004b; Slepnev y col., 2006). También hay

estudios que indican que después de un choque osmótico la inhibición de las MNKs no afecta a la recuperación de la síntesis global de proteínas, lo que implica que para ello no se requiere la fosforilación del eIF4E. Sin embargo, estos resultados muestran una deficiencia en el ensamblaje de polisomas en células tratadas con el inhibidor de MNK, CGP57380, conllevando la posibilidad de que la fosforilación del eIF4E contribuya de algún modo a la formación de polisomas (Morley y Naegle, 2002). Además, existen datos más recientes que indican que las MNKs regulan positivamente la traducción y el ensamblaje de polisomas (Bianchini y col., 2008; Zhang y col., 2008). En cambio, a diferencia de estos trabajos, existen otros que muestran resultados opuestos que revelan que las MNKs son reguladores negativos de la síntesis de proteínas. La sobreexpresión de las MNKs disminuye la traducción dependiente de cap en neuronas de *Aplysia* sugiriendo que la hiperfosforilación del eIF4E disminuye la síntesis de proteínas (Ross y col., 2006). Además, el tratamiento de células con CGP57380 mejora ligeramente la traducción dependiente de cap (Knauf y col., 2001), lo que está acorde con la idea de que las MNKs pueden jugar un papel negativo en la traducción dependiente del eIF4E. También se ha demostrado que transfectando células con siRNAs frente a MNK1a y MNK1b, para suprimir la expresión endógena de estas proteínas, se produce una disminución significativa en la fosforilación del eIF4E que induce un aumento en la formación del complejo eIF4F sin afectar a la síntesis global de proteínas (O'Loughlen y col., 2004b).

Por otro lado, los niveles activos del eIF4E se regulan mediante la interacción con la familia de proteínas de unión al eIF4E, 4E-BPs (4E-BP1, 2 y 3) (Gingras y col., 1999; Raught y col., 2000). El eIF4E tiene un mismo dominio de unión tanto para las 4E-BPs como para el eIF4G, lo que permite que las 4E-BPs puedan ejercer una inhibición competitiva sobre el eIF4E. Esto impide la interacción con el eIF4G e imposibilita que forme parte del complejo eIF4F, inhibiendo, por tanto, la traducción de proteínas dependiente de cap (Marcotrigiano y col., 1999; Svitkin y col., 2005). La unión de 4E-BPs al eIF4E está regulada por la fosforilación (Lin y col., 1994; Pause y col., 1994), de modo que cuando las 4E-BPs están hipofosforiladas se unen con avidez

al eIF4E mientras que si están hiperfosforiladas en diferentes residuos de Ser o Thr disminuye su eficacia de unión a este factor. Los estímulos que promueven el crecimiento celular provocan la fosforilación de las 4E-BPs, mientras que la infección de algunos tipos de virus y ciertas situaciones de estrés celular provocan la desfosforilación de estas proteínas (Gingras y col., 1999; Horton y col., 2002) (**Figura 2**).

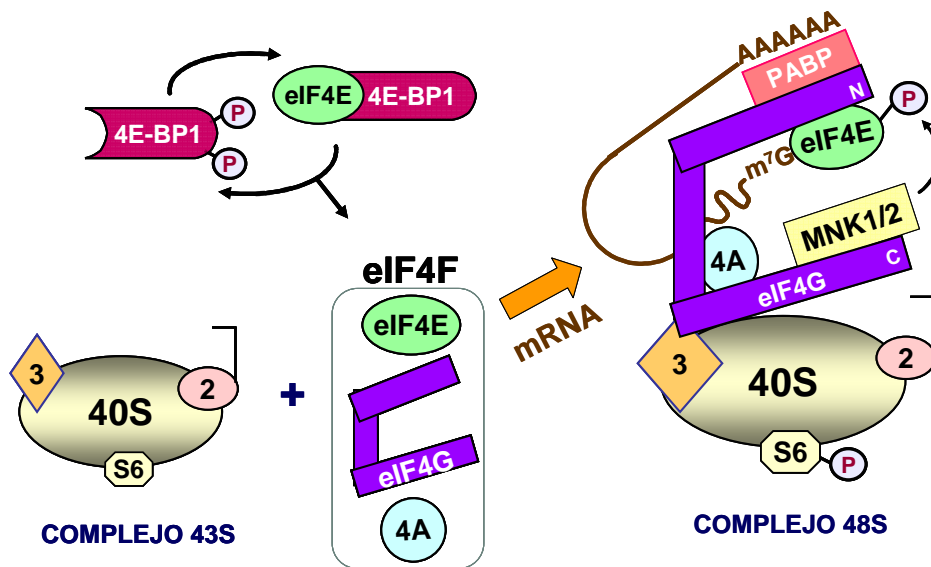


Figura 2. Modelo del mecanismo de acción de los factores eIF4 implicados en la traducción de mRNAs dependientes de la estructura cap. El complejo eIF4F, formado por los factores eIF4E, eIF4A (4A) y eIF4G, se asocia al complejo de preiniciación 43S y al mRNA para formar el complejo de iniciación 48S. El eIF4G se une al eIF4E en el extremo N-terminal a través de un dominio de unión, y al eIF4A y eIF3 (3) a través de un dominio situado en la zona central. Además, el eIF4A tiene otro dominio de unión en el extremo C-terminal. El eIF4G también tiene la capacidad de interactuar a través de su extremo N-terminal con la proteína PABP y por el extremo C-terminal con MNK1/2. La fosforilación del eIF4E es realizada *in vivo* por MNK1 cuando ambas proteínas se encuentran asociadas al eIF4G (Gingras y col., 1999; Pyronnet y col., 1999).

Las actividades eIF4E quinasa basales de las diferentes isoformas de MNK son distintas, al igual que su regulación (**Tabla 1**). MNK1a presenta baja actividad que aumenta en presencia de ERK o p38 MAPK, y disminuye con agentes que bloquean estas vías de señalización. Sin embargo, MNK2a posee una actividad basal muy alta, que puede ser débilmente incrementada por ERK. Los inhibidores de las rutas de

señalización de ERK o p38 MAPK son capaces de reducir la actividad de MNK2a, pero sólo débilmente. Estas propiedades parecen estar relacionadas con la capacidad de MNK2a para permanecer unida a ERK, incluso después de que ERK haya sido activada por fosforilación. Aunque, al igual que MNK2a, MNK1a también posee el dominio de unión a MAPK, ésta no se une de forma estable a ERK activada (Buxade y col., 2008b). MNK2b tiene una actividad basal muy baja y aún se desconocen las condiciones en las cuales se podría incrementar dicha actividad (Scheper y col., 2003). MNK1b muestra una alta actividad basal, más alta que la que presenta MNK1a, y su actividad es independiente de la activación de ERK/p38 MAPK (O'Loughlen y col., 2004a). Sin embargo, hay estudios que muestran que, aunque MNK1b no es activada por ERK, sí puede responder a la activación de otras vías de señalización de las MAPK como la de p38 y quinasas c-Jun N-terminal (JNKs) aumentando ligeramente su actividad (Goto y col., 2009). La presencia de las dos treoninas del bucle de activación de MNK1b es necesaria para su actividad, pero dicha actividad no depende del estado de fosforilación de las mismas. El hecho de que MNK1b pierda 77 aminoácidos en su extremo C-terminal respecto a MNK1a no justifica su alta actividad eIF4E quinasa, lo que parece indicar que MNK1bSR podría ser importante para dicha actividad (O'Loughlen y col., 2007). No obstante, otros autores han obtenido resultados distintos, sugiriendo que es la falta de estos 77 aminoácidos la característica responsable de la mayor actividad basal de la isoforma MNK1b (Goto y col., 2009).

Tabla 1. Características de las isoformas de las MNKs humanas.

ISOFORMA	ACTIVIDAD BASAL	REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD	LOCALIZACIÓN SUBCELULAR	COMENTARIOS
MNK1a	Baja	ERK y p38 MAPK	Citoplasmática	C-terminal largo que contiene NES y dominio de unión a MAPK
MNK1b	Alta	Se está investigando	Citoplasmática y nuclear	C-terminal muy corto que ha perdido NES y el dominio de unión a MAPK
MNK2a	Muy alta	Débilmente por ERK y p38 MAPK	Citoplasmática	C-terminal largo que no contiene NES pero sí el dominio de unión a MAPK
MNK2b	Muy baja	Desconocida	Citoplasmática y nuclear	C-terminal corto que ha perdido NES y el dominio de unión a MAPK

1.2.2 Factor de iniciación eucariótico 4G (eIF4G)

El factor eIF4G es una proteína compleja que interacciona con multitud de componentes de la maquinaria traduccional siendo el verdadero puente entre el mRNA y el ribosoma. El eIF4G es capaz de interactuar con MNK, eIF4E, eIF4A, eIF3, la proteína de unión a la cola de poli adeninas (PABP) y con el propio mRNA, lo que hace que esté implicado en varios procesos de la traducción como son: a) circularización del mRNA a través de la interacción con PABP y eIF4E (Wells y col., 1998), b) reclutamiento de la subunidad 40S del ribosoma al extremo 5' del mRNA gracias a las interacciones con el eIF4E y el eIF3, c) apertura de la estructura secundaria de la secuencia localizada en el extremo 5'UTR (región no traducible del mRNA) por acercamiento del eIF4A a esta región (Rozen y col., 1990) y d) acercamiento de la quinasa MNK1 a su sustrato, eIF4E (Pyronnet y col., 1999). Las MNKs se unen a través de su región polibásica, localizada en el extremo N-terminal, al extremo C-terminal del eIF4G (Waskiewicz y

col., 1999) mientras que el eIF4E lo hace a la región N-terminal del eIF4G (Lamphear y col., 1995) (**Figura 2**). Aunque hay estudios que sugieren que MNK puede fosforilar a eIF4G *in vitro* (Pyronnet y col., 1999), aún no hay una demostración clara de que esto ocurra ni del papel biológico que este hecho pueda tener.

1.2.3. Proteínas que unen elementos ricos en AU (AREs): hnRNP A1 y PSF

La ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1 (hnRNP A1) y el factor de *splicing* asociado a la proteína de unión al tramo de polipirimidina (PSF) son proteínas de unión a zonas de las regiones 3' no traducibles (3' UTRs) de los mRNAs que son ricas en residuos de A y U denominadas AREs.

hnRNP A1 es una proteína muy abundante que interviene en el metabolismo del mRNA. Aunque principalmente es nuclear, esta proteína está continuamente transportándose entre el núcleo y el citoplasma. Las MNKs fosforilan a hnRNP A1 en los residuos Ser 192 y Ser 310, en respuesta a la activación de las células T (Buxade y col., 2005). La fosforilación de hnRNP A1 disminuye su capacidad de interactuar con el mRNA del factor de necrosis tumoral α (TNF α) sugiriendo que las MNKs juegan un papel importante en la regulación de mRNAs específicos. Además hnRNP A1 también se fosforila en respuesta a estrés osmótico dependiente de p38 (van der Houven van Oordt y col., 2000) indicando que las MNKs también regulan la traducción de mRNAs específicos en condiciones de estrés.

PSF es una proteína nuclear que interviene en la transcripción y el procesamiento del RNA. Junto a p54^{nrb}, PSF forma el factor de transcripción y procesamiento (*transcription-splicing*) que está implicado en diversas funciones biológicas. Las MNKs fosforilan a PSF *in vitro* en los residuos Ser 8, que es fosforilado preferencialmente por MNK2, y Ser 283. Estas fosforilaciones incrementan la unión de PSF al mRNA del TNF α *in vivo* sugiriendo que las MNKs pueden regular el destino de mRNAs específicos modulando su unión a PSF/ p54^{nrb} (Buxade y col., 2008a).

1.2.4. Fosfolipasa A2 citoplasmática: cPLA2

La fosfolipasa A2 citoplasmática (cPLA2) juega un papel clave en la producción de eicosanoides, que participan en procesos de inmunidad e inflamación. MNK1 fosforila a cPLA2 en la Ser 727 *in vitro* (Hefner y col., 2000), lo que se regula mediante la vía de señalización de p38 MAPK en células. Esta fosforilación produce la activación de cPLA2 con lo que se libera ácido araquidónico de los glicerofosfolípidos para la producción de eicosanoides. Además, otras quinasas que se activan a través de p38 MAPK, MSK1 y MK5, también fosforilan a cPLA2 (Buxade y col., 2008b).

1.2.5. Sprouty: Spry2

Las proteínas sprouty (Spry) son un grupo de proteínas asociadas a membrana que suprimen la activación y/o señalización de ERK (Bundschuh y col., 2006). MNK1 fosforila a Spry2 en los residuos Ser 112 y Ser 121, y la sustitución de los mismos por Ala produce la desestabilización de Spry2 (DaSilva y col., 2006). El inhibidor de MNK, CGP57380, también lleva a la degradación de Spry2, sugiriendo que la fosforilación de Spry2 mediada por MNK1 podría alargar su vida media y, por tanto, su capacidad de inhibir la señalización de ERK.

1.3 IMPORTANCIA DEL eIF4E EN CÁNCER

En 1990 se publicó el primer trabajo que implicaba al eIF4E en el control del crecimiento celular y la transformación neoplásica (Lazaris-Karatzas y col., 1990). Estos autores demostraron que la sobreexpresión del eIF4E en la línea celular NIH3T3 da lugar al crecimiento de colonias en agar y produce tumores cuando se inoculan en ratones. Así mismo, otros autores han demostrado que la inhibición del eIF4E reduce el crecimiento de tumores y la malignización en modelos experimentales (De Benedetti y Graff, 2004; Graff y col., 1995). Por otra parte, se ha demostrado que el eIF4E se encuentra sobreexpresado en una gran variedad de tipos de cáncer como en tumores de mama, cuello y cabeza, colon, próstata, riñón, pulmón, etc. lo que se relaciona con

la progresión de la enfermedad (Culjkovic y Borden, 2009; De Benedetti y Graff, 2004; Thumma y Kratzke, 2007).

El eIF4E puede modular la expresión génica a dos niveles (**Figura 3**):

a) Participando en el transporte de algunos mRNAs del núcleo al citoplasma

El transporte del eIF4E al núcleo se produce gracias a la proteína transportadora del eIF4E (4E-T), la cual se une al eIF4E a través de los sitios de unión compartidos con 4E-BPs y eIF4G y, simultáneamente, interactúa con los receptores nucleares (Dostie y col., 2000). En el núcleo, la capacidad del eIF4E para regular la exportación de mRNAs depende de su estado de fosforilación y de los elementos sensibles al eIF4E (4E-SE: eIF4E sensitivity element) presentes en las regiones 3'UTR de los mRNAs (Culjkovic y col., 2005). En este proceso, el eIF4E se asocia con la proteína transportadora nuclear CRM1, los mRNAs específicos y los cofactores adecuados para facilitar la salida al citoplasma (Culjkovic y col., 2006; Topisirovic y col., 2009). Además, la sobreexpresión del eIF4E altera la composición del poro nuclear lo que conlleva un incremento de la exportación de mRNAs específicos (Culjkovic-Kraljacic y col., 2012). Algunos de los mRNAs que son transportados del núcleo al citoplasma mediante el eIF4E son los de proteínas implicadas en el crecimiento celular como la ciclina D1, ornitina descarboxilasa (ODC) y HDM2 (Phillips y Blaydes, 2008; Rousseau y col., 1996; Topisirovic y col., 2004).

b) Aumentando la eficiencia traduccional de algunos mRNAs que ya están en el citoplasma

Aquellos mRNAs con estructuras secundarias complejas en la región 5' no traducible (5'UTR) son particularmente dependientes de la actividad del eIF4E, con lo que un aumento de la expresión del eIF4E estimula de forma preferente la traducción de estos mRNAs, que codifican para proteínas implicadas en la proliferación y la apoptosis (Gingras y col., 1999). Algunas de estas proteínas son el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos

(FGF), que facilitan la angiogénesis, Bcl-2, que participa en la supervivencia celular, metaloproteinasas (MMPs), implicadas en la invasión, y c-myc, ciclina D1 y ODC que estimulan el crecimiento (Bilanges y Stokoe, 2007; Culjkovic y col., 2007). Además, el eIF4E también se ha encontrado formando parte de cuerpos de procesamiento o *P-bodies* y gránulos de estrés lo que indica que participa en el secuestro y/o recambio del mRNA (Ferraiuolo y col., 2005; Parker y Sheth, 2007).

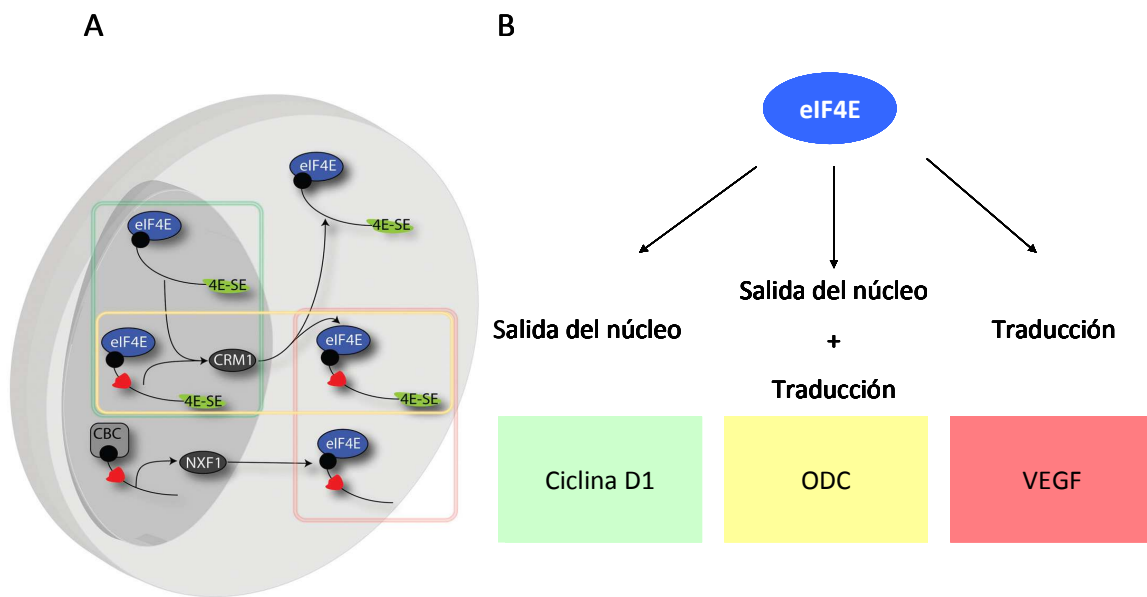


Figura 3. Funciones del eIF4E en la modulación de la expresión génica. (A) En el núcleo, representado en gris oscuro, se encuentran las proteínas de unión al cap, eIF4E y CBC (complejo de unión al cap). La mayoría de los mRNAs son exportados al citoplasma mediante su unión a CBC y a través de NXF1 (*nuclear RNA export factor 1*), proteína transportadora. Los mRNAs se representan como líneas negras y los círculos negros representan el cap. La salida al citoplasma de los mRNAs que presentan 4E-SE, en verde, se produce mediante CRM1. En el citoplasma, los mRNAs con estructuras 5' UTR, en rojo, se traducen preferencialmente de modo dependiente del eIF4E. Los recuadros de colores se corresponden a los niveles de regulación mostrados en (B). **(B)** Representación esquemática que muestra cómo el eIF4E, en función de las señales de los mRNAs, modula su regulación, mostrándose algunos ejemplos. Modificado de (Culjkovic y col., 2007).

Como se explica en el apartado 1.2.1, a pesar del gran número de trabajos realizados en los últimos años, hasta el momento no se ha establecido el papel funcional de la fosforilación del eIF4E. Por un lado, parece claro que disminuye la afinidad del eIF4E por el cap de los mRNAs (Scheper y col., 2002) y que puede regular el transporte de determinados mRNAs del núcleo al citoplasma (Topisirovic y col.,

2004). También hay estudios que apoyan el papel de la fosforilación del eIF4E en la tumorigénesis, ya que se ha demostrado que la fosforilación del eIF4E nuclear parece ser importante para el control del transporte del mRNA de la ciclina D1 y de las propiedades transformantes del eIF4E. Otros estudios han establecido que la fosforilación del eIF4E en la Ser 209 por las MNKs es un requisito absoluto para la acción oncogénica de éste. Así, en varias líneas tumorales de mama, la sobreexpresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) se correlaciona con la actividad de las MNKs y la inhibición de las MNKs, con el inhibidor específico CGP57380, reduce la formación de colonias en agar (Chrestensen y col., 2007b). Además, en un modelo experimental de ratones, la sobreexpresión de una MNK1 constitutivamente activa disminuye la apoptosis y acelera la aparición de tumores mientras que un mutante inactivo atenúa la aparición de estos tumores (Wendel y col., 2007). La tumorigénesis se suprime por la pérdida de MNK1/2 en otro modelo de ratón con linfoma fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) negativo (Ueda y col., 2010). Recientemente, se han descrito niveles significativamente más altos del eIF4E fosforilado en tejido tumoral humano que en los tejidos sanos adyacentes, lo que apoya el papel de la fosforilación del eIF4E en el desarrollo del cáncer (Fan y col., 2009).

La desregulación de la síntesis de proteínas es clave en la transformación oncogénica y en el mantenimiento de un tumor. En el contexto celular, el eIF4E es diana de las vías de señalización PI3K/PTEN/AKT/mTOR y Ras/Raf/MAPK, de manera que la vía de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) lleva a un aumento en la actividad del eIF4E debido a su liberación de 4E-BP1 y la vía de las MAPK aumenta la fosforilación del eIF4E mediante MNK1/2 (**Figura 4**).

La vía de señalización PI3K/PTEN/AKT/mTOR es la más relacionada con la tumorigénesis y con la sensibilidad y resistencia a las terapias contra el cáncer. La desregulación de la señalización de esta vía suele deberse a alteraciones genéticas y/o mutaciones (Hou y col., 2012). Factores de crecimiento, mitógenos y citoquinas activan

a la PI3K que inicia una cascada de eventos en las células. La quinasa dependiente de 3' fosfoinositol 1 (PDK1) activa a la proteína quinasa B (AKT ó PKB) que, mediante la inactivación del complejo supresor de tumores 1 y 2 (TSC1/2), activa al complejo 1 de la proteína quinasa diana de rapamicina en mamíferos (mTORC1). La activación de PDK1 y AKT por PI3K está regulada negativamente por PTEN (Chappell y col., 2011). PTEN es un gen supresor de tumores que se encuentra habitualmente mutado o silenciado en cánceres humanos (McCubrey y col., 2011). Su pérdida produce una activación de AKT y de la señalización de mTORC1. mTORC1 regula el ensamblaje del complejo eIF4F, ya que fosforila a las 4E-BPs, lo que implica la disociación del eIF4E, la unión de éste al eIF4G y, en consecuencia, la formación del complejo eIF4F. Además, mTORC1 también promueve la activación de la quinasa S6K, que fosforila a la proteína ribosomal S6 y a otros sustratos, incluyendo al factor eIF4B (Shahbazian y col., 2006). Debido a la importancia en el cáncer de esta vía de señalización, las quinasas de esta ruta se han utilizado como dianas terapéuticas y se han identificado inhibidores farmacológicos de las mismas (Brachmann y col., 2009; Meric-Bernstam y Gonzalez-Angulo, 2009). Sin embargo, se ha demostrado que un tratamiento prolongado de líneas celulares tumorales o pacientes con inhibidores de mTOR produce alta actividad de PI3K, lo que conlleva la supervivencia de las células cancerosas (Costa y F, 2007). A la vista de estos resultados, y puesto que se producen mecanismos de oncogénesis y resistencia a fármacos *in vivo*, se ha propuesto inhibir AKT y mTOR simultáneamente o directamente inhibir la actividad del eIF4E como tratamientos contra el cáncer (Wang y col., 2007). También hay trabajos que han demostrado que la fosforilación de las 4E-BPs se encuentra elevada y asociada a la progresión tumoral en cáncer de mama, ovario, próstata y colon (Armengol y col., 2007).

Por otro lado, el eIF4E es diana de la cascada de señalización celular Ras/Raf/MAPK que es activada por factores de crecimiento y mitógenos. Ras-GTP, pero no Ras-GDP, se une a Raf-1 que activa a MEK (MAP quinasa de ERK), también conocida como MAPKK (MAP quinasa quinasa). Las distintas variantes de las MEK fosforilan a ERK1/2 y a p38 α/β , que fosforilan a MNK1 y MNK2. A su vez, las MNKs fosforilan al

eIF4E en la Ser 209, lo cual se requiere para que el eIF4E tenga efectos oncogénicos (Wendel y col., 2007). La vía de ERK está activada en muchos cánceres debido a mutaciones activadoras en la proteína Ras o debido a la pérdida de función de la proteína neurofibromina 1 (NF1). NF1 es una proteína que inhibe la actividad de Ras a través de la activación de la Ras GTPasa que hidroliza el GTP, por lo que la proteína Ras se encuentra unida a GDP, en estado inactivo (Hou y col., 2012).

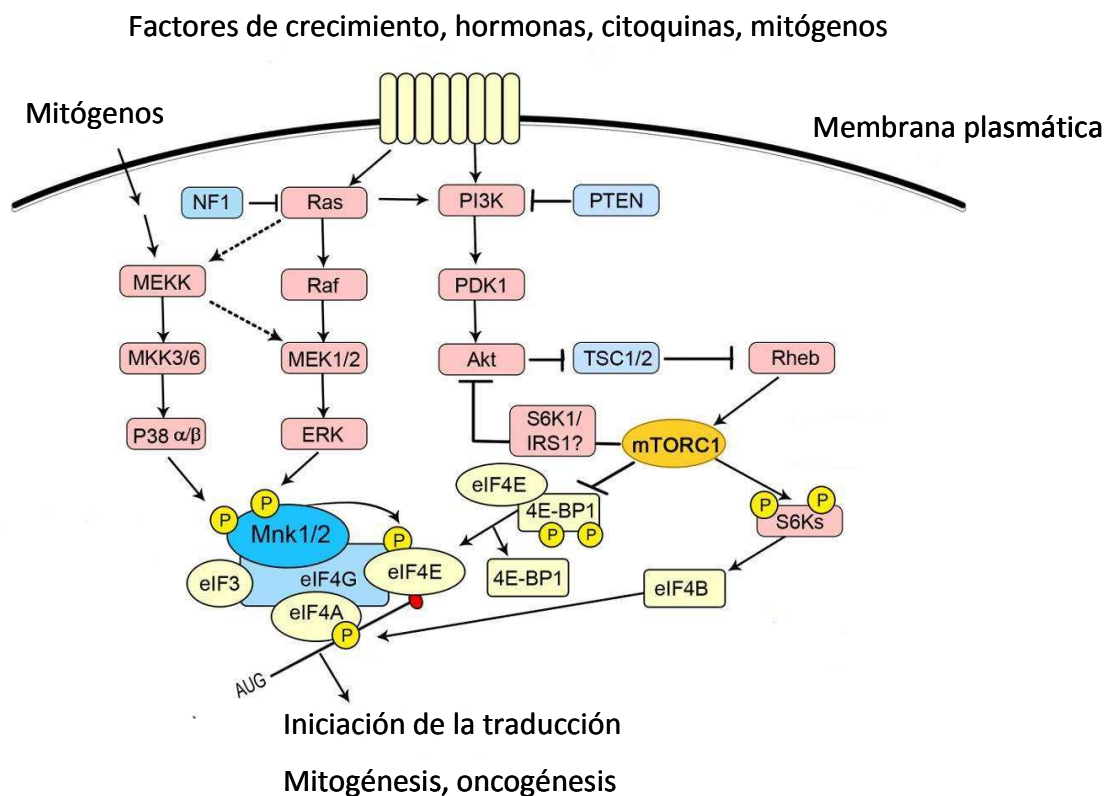


Figura 4. La regulación del eIF4E supone la convergencia de dos vías de señalización celular. La vía de señalización celular de Ras/Raf/ERK conlleva la activación de las MNKs, que además son activadas por las p38 MAPK. Las MNKs se unen al eIF4G y fosforilan al eIF4E formando también el complejo eIF4F. En respuesta a factores de crecimiento u otros estímulos, la activación de PI3K inicia una cascada de eventos en la que PDK1 activa a AKT que fosforila TSC2 inactivando el complejo TSC1/TSC2. Consecuentemente, Rheb activa mTORC1 que promueve la activación de S6K. Además se produce la fosforilación de 4E-BP1 con lo cual se libera eIF4E. La S6K activada fosforila al eIF4B lo que promueve la actividad helicasa del eIF4A. Las líneas punteadas indican posibles relaciones. Modificado de (Hou y col., 2012).

1.4 OTRAS FUNCIONES CELULARES DE LAS MNKS

La disponibilidad de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) sin MNKS (Ueda y col., 2004) ha permitido realizar más estudios dirigidos a conocer el papel de estas quinasas. Las células MEFs doble *knock-out* para MNKS en respuesta a la retirada de suero experimentan más fácilmente apoptosis respecto a las MEF WT (*wild type*) o células *knock-out* para una de las dos MNKS (MNK1 o MNK2) (Chrestensen y col., 2007a). El tratamiento de MEF WT con el inhibidor CGP57380 sensibiliza a las células frente a la apoptosis más que la retirada de suero, lo que puede ser debido a la pérdida de función de MNK. La reintroducción de MNK1 o MNK2 en los MEFs doble *knock-out* aumenta la fosforilación del eIF4E en niveles similares, pero sólo en el caso de MNK1 se encontró una disminución en la sensibilidad a la apoptosis. Estos estudios sugieren que las MNKS, probablemente a través de un sustrato de MNK1, están implicadas en cascadas de señalización anti-apoptóticas. Existen datos que relacionan a MNK1 de ratón con la caspasa-3, de manera que la forma activa de la proteína quinasa activada por caspasas 2 (PAK-2), generada a partir de la rotura por la caspasa-3, fosforilaría a MNK1 en los residuos Thr 22 y Ser 27, impidiendo así que ésta se una y fosfore al eIF4G (Orton y col., 2004). Sin embargo, estos efectos ocurren tras la activación de la caspasa-3 mientras que resultados obtenidos por otros autores sugieren que MNK1 interviene antes de esta activación (Chrestensen y col., 2007a).

Las vías de señalización celular de las MAPK juegan un papel importante en la producción de citoquinas relacionadas tanto con la inmunidad innata como con la adquirida (Zhang y Dong, 2005). Las MNKS, que intervienen en las cascadas de las MAPK, también son mediadoras de la producción de citoquinas. Se ha demostrado que la inhibición de la actividad de MNK con CGP57380 produce una disminución en la producción de TNF α por los macrófagos después de un tratamiento con múltiples agonistas de la familia *Toll like receptor* (TLR) (Rowlett y col., 2008). Otros estudios comprobaron que la inhibición de las MNKS con CGP57380 en cultivos de queratinocitos humanos disminuye la liberación de TNF α , IL-6 e IL-1 β en respuesta a la estimulación con anisomicina, que es agonista de la p38 MAPK (Kjellerup y col., 2008).

El mecanismo por el cual las MNKs participan en la regulación de la síntesis de $\text{TNF}\alpha$, es a través de la fosforilación de la proteína hnRNP A1 lo que produce que esta última pierda la capacidad de unirse al mRNA del $\text{TNF}\alpha$ conllevando la desrepresión de su traducción (Buxade y col., 2008b). Todos estos estudios establecen que las MNKs median señales importantes en respuestas proinflamatorias, por lo que la inhibición de las MNKs no sólo tendría aplicaciones terapéuticas en cáncer sino también en el tratamiento de otras enfermedades como el Alzheimer, artritis reumatoide, psoriasis y enfermedad de Crohn, entre otras, en las que hay una desregulación en la producción de citoquinas y en la respuesta inmune (Joshi y Platanias, 2012).

2. BIOLOGÍA MOLECULAR EN CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad compleja que incluye campos de estudio muy distintos a nivel clínico, morfológico y molecular. Como esta enfermedad es muy heterogénea, no sólo se estudian parámetros como el tamaño del tumor, el grado histológico y biomarcadores utilizados rutinariamente en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes, sino que es necesario profundizar en su biología molecular. Durante la última década, los avances tecnológicos y el alto rendimiento de las investigaciones han revelado que el cáncer de mama requiere la interconexión de varias vías de señalización celular y que tanto el microambiente celular como las características de cada paciente influyen en la fisiopatología, recuperación y respuesta al tratamiento. Aunque cada vez se está más cerca de poder ofrecer una medicina personalizada, todavía hay muchas preguntas sin resolver, existiendo una gran necesidad de identificar y validar nuevos marcadores moleculares y dianas terapéuticas (Eroles y col., 2012).

El grupo de investigación de Perou en el año 2000 (Perou y col., 2000) fue el primero en clasificar el cáncer de mama en subtipos intrínsecos basados en perfiles de expresión génica. Esta clasificación, validada por grupos independientes (Sotiriou y col., 2003), se basa en el análisis de grupos de tumores según sus características

biológicas, sin tener en cuenta sus variables clínicas o pronósticas. Recientemente, se han ido añadiendo nuevos subtipos, puesto que esta clasificación es un modelo abierto y en desarrollo, que necesita mejoras y estandarización para poder ser aplicado en clínica. En este trabajo se han considerado los siguientes subtipos moleculares (**Tabla 2**):

- **Luminal A (LA)**. Es el subtipo más común y representa el 50-60% del total. Se caracteriza por expresar receptores de estrógenos (ER) y/o de progesterona (PR), ausencia de HER2, tener bajo ratio de proliferación, medido por Ki67, y un grado histológico bajo. Ki67 es un antígeno nuclear (Gerdes y col., 1991) expresado en las células en las fases proliferativas del ciclo celular (G1, G2, M y S) para el cual existe un anticuerpo que es un buen marcador de proliferación celular. Los pacientes con este subtipo tienen buen pronóstico.

- **Luminal B (LB)**. Este grupo engloba el 10-20% de todos los cánceres de mama. Tiene un fenotipo más agresivo, mayor grado histológico e índice proliferativo y peor pronóstico que el LA. Se caracteriza por expresar ER y/o PR, HER2 o ausencia de HER2 y Ki67 elevado.

- **HER2**. El 15-20% de todos los cánceres de mama corresponden a este subtipo. Presentan mal pronóstico, grado histológico alto, sobreexpresión de genes relacionados con la proliferación celular y expresión de HER2 en ausencia de ER y PR.

- **Triple negativo (TN)**. Este subtipo comprende el 10-20% del total de los carcinomas de mama. Clínicamente se caracterizan por aparición a edad temprana, gran tamaño del tumor en el diagnóstico, grado histológico alto y alta frecuencia de afectación de los ganglios linfáticos (Bosch y col., 2010). La particularidad más relevante de este grupo es la ausencia de expresión de los tres receptores claves, ER, PR y HER2, con lo que se pierden estas dianas terapéuticas, y resulta ser el subtipo de peor pronóstico.

Tabla 2. Características de los subtipos moleculares de cáncer de mama *.

SUBTIPO MOLECULAR	FRECUENCIA	ER/PR/HER2	Ki67	GRADO HISTOLÓGICO	PRONÓSTICO
LA	50-60 %	ER+ y/o PR+ HER2-	Bajo	Bajo	Bueno
LB	10-20 %	ER+ y/o PR+ HER2-/+	Alto	Intermedio/ Alto	Intermedio/ Malo
HER2	15-20 %	ER- PR- HER2+	Alto	Alto	Malo
TN	10-20 %	ER- PR- HER2-	Alto	Alto	Malo

* Datos de (Eroles y col., 2012)

Los tratamientos son variables en función de cada subtipo. Los pacientes LA suelen requerir sólo terapia endocrina que también puede formar parte del tratamiento de los LB. La quimioterapia se recomienda para la mayoría de los LB, HER2 y TN teniendo en cuenta que a los que expresan HER2 se les suele tratar también con trastuzumab (Goldhirsch y col., 2011).

3. APTÁMEROS

Al igual que las proteínas, los ácidos nucleicos son capaces de plegarse en complicadas estructuras terciarias que permiten desempeñar funciones como regulación génica, actividad catalítica y unión a ligandos (Weigand y Suess, 2009). La introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la biología molecular en el año 1987 (Mullis y col., 1992; Saiki y col., 1985) permitió que pocos años más tarde tres grupos de investigadores de forma independiente describieran un mecanismo de selección molecular *in vitro* que permite el aislamiento de pequeños ácidos nucleicos capaces de interaccionar de forma específica con sus moléculas diana (Ellington y Szostak, 1990; Robertson y Joyce, 1990; Tuerk y Gold, 1990). Este proceso de selección se denomina método SELEX (*Systematic Evolution of Ligand by EXponential enrichment*), y se basa en la identificación de moléculas con alta afinidad y especificidad por un ligando, que se denominan aptámeros, a partir de librerías

complejas de oligonucleótidos obtenidas por síntesis química combinatorial (**Figura 5**). Estas librerías iniciales, que pueden ser de RNA o DNA de cadena sencilla (ssDNA), están constituidas por oligonucleótidos formados por una región central de 30-80 nucleótidos en disposición aleatoria y dos regiones flanqueantes de secuencia conocida, de 18-21 nucleótidos de longitud, a las que se unirán los cebadores en la amplificación por PCR. El método SELEX consiste en la realización de varias rondas de selección. En cada ronda, se incuba la librería de oligonucleótidos con la molécula diana y un número muy pequeño de secuencias individuales tiende a interaccionar específicamente con la misma. Estas secuencias son aisladas del resto de la librería utilizando diferentes técnicas físicas de separación. Las secuencias que se unen a la molécula diana son amplificadas por PCR para obtener una librería enriquecida que es usada durante la siguiente ronda o ciclo de selección-amplificación. Después de la PCR, como el DNA obtenido es de doble cadena, se lleva a cabo una desnaturalización térmica a 90°C para que se separen las cadenas y una renaturalización posterior a 4°C para que cada aptámero forme su estructura correspondiente. Además, ya sea a partir de una población o de clones de aptámeros individuales, existen métodos para separar la secuencia de DNA del aptámero de su complementaria. Algunos de estos métodos son electroforesis y posterior elución de la banda correspondiente, PCR asimétrica, que consiste en utilizar concentraciones diferentes de los cebadores para favorecer la obtención de cadena sencilla, digestión enzimática de la cadena complementaria con exonucleasa y el marcaje de los aptámeros con biotina y utilización de una resina conjugada con estreptavidina (Cruz-Aguado y Penner, 2008; Svobodova y col., 2012). La eficacia del enriquecimiento en moléculas que interaccionan con alta afinidad es dirigida por la astringencia de la selección en cada ciclo, obteniéndose una nueva población enriquecida con ligandos que presentan mayor afinidad por la diana. El número requerido de ciclos de selección-amplificación depende de gran variedad de parámetros como las características y concentración de la diana, el diseño de la librería de oligonucleótidos inicial, las condiciones de selección, la ratio de moléculas diana respecto a oligonucleótidos o la eficiencia del método de separación de las secuencias no unidas (Stoltenburg y col., 2007). A lo largo del proceso de selección se realizan

pruebas como ensayo enzimático en placa con aptámeros (ELONA), *SLOT-Blot* u otras, que permiten detectar si la población se encuentra enriquecida en aptámeros específicos frente a la diana. Cuando esto es así, el proceso SELEX se puede dar por concluido. Entonces, a partir de esta población y mediante el clonaje en plásmidos, se obtienen aptámeros individuales que se secuencian y posteriormente se caracterizan.

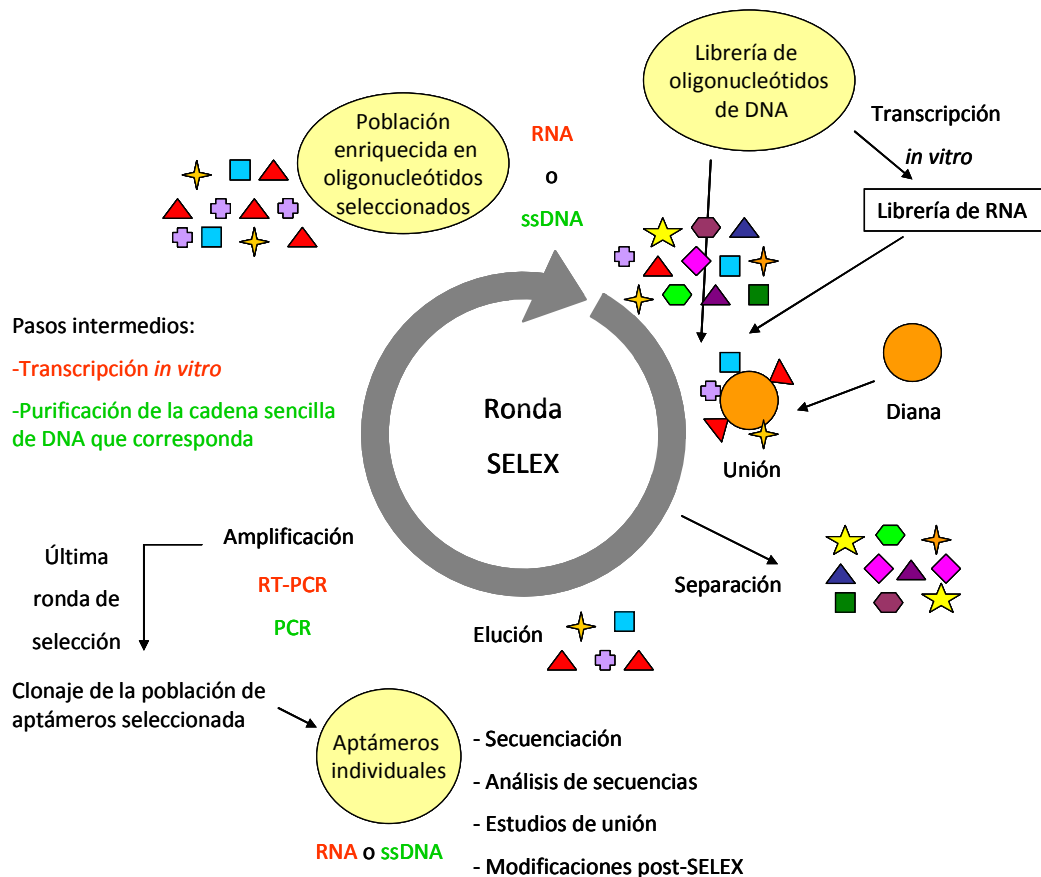


Figura 5. Selección de aptámeros *in vitro* mediante la tecnología SELEX. Cada proceso SELEX comienza a partir de una librería de oligonucleótidos de DNA con secuencias aleatorias. Esta librería se utiliza directamente para seleccionar aptámeros de DNA mientras que es transcrita a RNA para seleccionar aptámeros de RNA. El proceso SELEX se caracteriza por la repetición de las etapas sucesivas de selección (unión, separación y elución), amplificación y pasos intermedios. El grupo de oligonucleótidos seleccionados se utiliza en la siguiente ronda de selección. En general, para obtener aptámeros específicos se necesitan de 6-20 rondas de selección. La última ronda de SELEX finaliza tras la amplificación. La población enriquecida de aptámeros específicos se clona y se caracterizan los aptámeros individuales. Modificado de (Stoltenburg y col., 2007).

Los aptámeros, término que deriva de la palabra latina “aptus” que significa encajar y de la palabra griega “meros” que significa molécula (Ellington y Szostak, 1990), son moléculas de RNA o DNA de cadena sencilla capaces de reconocer de forma estable, específica y con alta afinidad una molécula diana debido a la estructura que son capaces de adoptar. La unión del aptámero, que presenta formas complejas como son tallos, horquillas, bucles, motivos *pseudoknots*, G-tríplex, G-cuádruplex etc. (**Figura 6**) a la diana, es el resultado de una combinación de interacciones equimoleculares en el complejo de unión, que consisten en fuerzas de complementariedad de bases, interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno (Hermann y Patel, 2000). Existen programas informáticos especializados que pueden predecir las estructuras secundarias de los aptámeros en base a sus secuencias (Davis y col., 1996) e incluso detectar la posibilidad de que presenten G-cuádruplex, como los programas Mfold y QGRS Mapper.

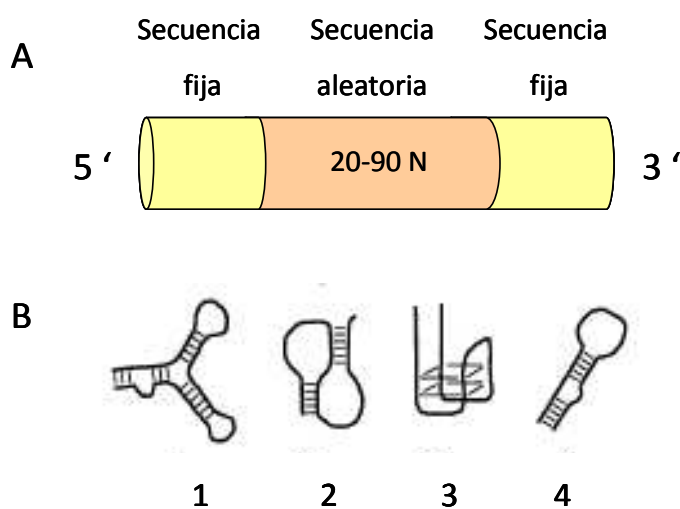


Figura 6. Representación esquemática de los aptámeros y sus posibles estructuras secundarias. (A) Esquema de un aptámero lineal. **(B)** Estructuras secundarias: horquillas (1 y 4), *pseudoknot* (2) y G-cuádruplex (3). Modificado de (Kulbachinskiy, 2007).

Los aptámeros, en base a sus estructuras tridimensionales, pueden unirse a una amplia variedad de dianas, ya sean moléculas sencillas, complejas u organismos enteros. Se han descrito aptámeros frente a moléculas inorgánicas (Hofmann y col., 1997), orgánicas de pequeño tamaño (Grate y Wilson, 2001), proteínas (Stoltenburg y

col., 2005), carbohidratos (Masud y col., 2004), nucleótidos (Sazani y col., 2004), antibióticos (Berens y col., 2001), virus (Balogh y col., 2010) e incluso células (Mallikaratchy y col., 2007; Shangguan y col., 2006), tejidos y organismos enteros (Chen y col., 2007). Los diferentes experimentos SELEX demuestran que la selección es posible para, en principio, cualquier diana que se encuentre en cantidad suficiente y con alto grado de pureza. Existe una base de datos con una relación de todos los aptámeros publicados frente a diversas dianas: <http://aptamer.icmb.utexas.edu/>.

En muchos aspectos, la población de aptámeros enriquecida podría asemejarse a anticuerpos policlonales, y los aptámeros individuales obtenidos a partir de la población, podrían asemejarse a anticuerpos monoclonales (Chen y col., 2007; Liss y col., 2002). Los aptámeros presentan una serie de ventajas respecto a los anticuerpos (**Tabla 3**). En primer lugar, el proceso de selección *in vitro* permite un mayor control de las condiciones de unión a la diana siendo independiente de la utilización de animales y siendo también aplicable a condiciones no fisiológicas. En segundo lugar, los aptámeros son más estables y pueden ser desnaturalizados reversiblemente cambiando las condiciones, mientras que la desnaturalización de los anticuerpos es irreversible. Además, a diferencia de los anticuerpos, los aptámeros pueden ser generados frente a dianas tóxicas o dianas que no provocan respuesta inmunológica *in vivo* (Jayasena, 1999). Otra ventaja es que los aptámeros presentan baja o ninguna inmunogenicidad lo que es importante en aplicaciones terapéuticas en animales o humanos (Nimjee y col., 2005). Y también, la naturaleza nucleotídica de los aptámeros permite modificaciones y la introducción de grupos funcionales para mejorar la estabilidad o la unión a la diana así como su rápida producción a gran escala. Los aptámeros tienen algunas limitaciones ya que su estructura terciaria es muy dependiente de las condiciones en las que se encuentren, son fácilmente degradados en sangre y presentan una menor diversidad biológica que los anticuerpos. Sin embargo, algunos de estos problemas pueden ser solucionados mediante modificaciones químicas (McKeague y Derosa, 2012). Al igual que los anticuerpos, los aptámeros modificados pueden ser utilizados en diversas técnicas como ELISA/ELONA

(Drolet y col., 1996; Ferreira y col., 2008), *western blot* (Murphy y col., 2003), electroforesis capilar (Wang y col., 2008b), citometría de flujo (Huang y col., 2008), imágenes *in vivo* (Charlton y col., 1997), HPLC (Michaud y col., 2003; Muller y col., 2008) y microarrays (Bock y col., 2004; Brody y col., 1999). Los aptámeros también pueden emplearse en otras aplicaciones analíticas como cromatografía, espectrometría de masas, sensores y biosensores, ya que son herramientas moleculares importantes para la identificación de dianas y para estudios diagnósticos y terapéuticos (Tombelli y col., 2005).

Tabla 3. Diferencias entre los aptámeros y los anticuerpos.

APTÁMEROS	ANTICUERPOS
Se producen por síntesis química con muy baja o sin variación de lote a lote.	Suelen sufrir variaciones de lote a lote.
Se seleccionan mediante un sistema <i>in vitro</i> que no requiere animales.	Requiere el uso de animales.
Pueden obtenerse aptámeros frente a proteínas no inmunogénicas y toxinas.	Sólo pueden obtenerse frente a proteínas inmunogénicas pero no frente a dianas que representen constituyentes del cuerpo y sustancias tóxicas.
Los aptámeros desnaturalizados pueden ser regenerados en minutos, pueden ser almacenados durante mucho tiempo y transportados a temperatura ambiente.	Tienen una vida media limitada y son sensibles a la temperatura pudiéndose desnaturalizar muy fácilmente.
Las condiciones de la selección pueden ser manipuladas para obtener aptámeros estables en un amplio rango de condiciones ambientales, incluyendo pH y temperatura.	No es posible la obtención de anticuerpos que reconozcan dianas bajo condiciones distintas a las fisiológicas.
Pueden ser conjugados con moléculas marcadoras en localizaciones precisas que no estén implicadas en la interacción con la diana.	El marcaje de anticuerpos puede causar pérdida de afinidad.
No son inmunogénicos.	Suelen ser inmunogénicos.
Pueden ser fácilmente modificados incrementando su estabilidad.	La estabilidad de los anticuerpos no puede ser fácilmente alterada.
Su pequeño tamaño permite una entrada más eficiente en las células y en sus compartimentos.	Su mayor tamaño limita su acceso a los compartimentos celulares.

La interacción entre los aptámeros y sus dianas, y los efectos que producen en determinados procesos y mecanismos reguladores celulares, se utilizan tanto en investigación básica, como en el desarrollo de nuevas herramientas para terapias y métodos de diagnóstico en medicina. El primer aptámero aprobado para uso terapéutico en humanos es pegaptanib, denominado también Macugen[®] (Eyetechn Pharmaceuticals, Inc., USA). Este aptámero es administrado localmente y une e inhibe la isoforma del VEGF implicada en la degeneración macular relacionada con la edad, reduciendo el crecimiento patológico de ciertos vasos sanguíneos (Chakravarthy y col., 2006). Otros aptámeros que están siendo desarrollados y estudiados en clínica son REG1/RB006/RB007 (Regado Biosciences, USA) que es específico para el factor de coagulación IXa y se utilizaría como anticoagulante reversible durante intervenciones coronarias percutáneas (Chan y col., 2008), ARC1779 (Archemix, USA) que se une al dominio A1 del factor *von Willebrand* inhibiendo su unión a las plaquetas y produciendo un efecto antitrombótico (Diener y col., 2009), así como NOX-A12 y NOX-E36 (NOXXON Pharma, Alemania) que son específicos de citoquinas y se utilizarían en el tratamiento de múltiples mielomas y en diabetes tipo 2 (Maasch y col., 2008; Sayyed y col., 2009).

En lo que respecta al tratamiento del cáncer, se han descrito recientemente aptámeros que parecen tener un elevado potencial como agentes terapéuticos (Mallikaratchy y col., 2007; Phillips y col., 2008; Sefah y col., 2009; Tang y col., 2007) con capacidad para internalizarse en células acoplados a RNA de interferencia (Chu y col., 2006b; McNamara y col., 2006), conjugados con toxinas (Chu y col., 2006a) o con drogas (Bagalkot y col., 2006). En cáncer, el aptámero más desarrollado es el AS1411 o AGRO001 (Antisoma, UK), que es rico en guaninas y tiene efectos antiproliferativos, ya que se une a la nucleolina de la superficie celular de las células cancerosas y se internaliza llevando a la inhibición de la replicación del DNA (Bates y col., 2009). Este aptámero actualmente se encuentra en ensayos clínicos en fase II para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda. En estudios preclínicos, el aptámero de DNA, GBI-10 se une a la tenascina C, proteína de la matriz extracelular de algunos tumores (Daniels y

col., 2003). Se han descrito aptámeros peptídicos que se unen al factor STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3) produciendo apoptosis en las células tumorales (Nagel-Wolfrum y col., 2004) y aptámeros de RNA frente a las proteínas Ku relacionadas con la reparación del DNA (Zhang y col., 2004). El hecho de que los aptámeros sean capaces de diferenciar dianas distintas pero muy relacionadas que permitan discernir entre células tumorales de las que no lo son es muy importante en cáncer. Se han generado aptámeros capaces de distinguir isoformas de la proteína quinasa C (PKC) (Conrad y col., 1994) y capaces de reconocer el estado nativo y desnaturalizado de ERK2 (Bianchini y col., 2001).

Además, existen aptámeros que interaccionan con proteínas que regulan los pasos de iniciación en la síntesis de proteínas y que inhiben la traducción dependiente de cap. Hay aptámeros frente al eIF4E que inhiben la síntesis de proteínas, pero no su interacción con 4E-BP1 (Mochizuki y col., 2005), y frente al factor eIF4A, que inhiben la hidrólisis de ATP, pero no interfieren en la unión al eIF4G (Oguro y col., 2009). Se han seleccionado varios aptámeros frente al factor eIF4G con capacidad para detener la traducción, algunos de ellos se unen a las regiones que interactúan con eIF4A y eIF3, mientras que otros inhiben fuertemente la traducción dependiente de cap por un mecanismo desconocido (Miyakawa y col., 2006).

La tecnología de los aptámeros representa un amplio campo de estudio que no sólo permite la obtención de nuevas herramientas en investigación básica, sino también avances en medicina aplicables a la prevención, diagnóstico y tratamiento de múltiples enfermedades.

OBJETIVOS

La proteína quinasa que interacciona con MAP quinasas 1b (MNK1b) es una variante, generada por procesamiento alternativo de la MNK1a humana, que se describió en nuestro laboratorio (O'Loughlen y col., 2004a). MNK1b posee una actividad basal mucho mayor que MNK1a para fosforilar al eIF4E que parece ser debida a la presencia de una región específica en la zona C-terminal de MNK1b (MNK1bSR) (O'Loughlen y col., 2007). El eIF4E se une específicamente al cap, estructura del extremo 5' del mRNA en eucariotas, reclutando al ribosoma y formando parte del complejo eIF4F para que tenga lugar la iniciación de la traducción. La regulación del eIF4E es clave en la iniciación de la síntesis de proteínas y en la modulación de la expresión de genes relacionados con la proliferación y supervivencia celular como la ciclina D1, ODC y HDM2 (Topisirovic y col., 2004). Las MNKs fosforilan al eIF4E en la Ser 209, lo que se requiere para que el eIF4E tenga efectos oncogénicos (Wendel y col., 2007). Se ha demostrado que el eIF4E se encuentra sobreexpresado en una gran variedad de tipos de cáncer como en tumores de mama, cuello y cabeza, colon, próstata, riñón, pulmón etc. lo que se relaciona con la progresión de la enfermedad (De Benedetti y Graff, 2004; Thumma y Kratzke, 2007). En un modelo experimental de ratones, la sobreexpresión de una MNK1 constitutivamente activa disminuye la apoptosis y acelera la aparición de tumores, mientras que un mutante inactivo atenúa la aparición de estos tumores (Wendel y col., 2007). En estudios previos no publicados del grupo al que corresponde este trabajo, también se han encontrado niveles elevados de MNK1b en muestras de tumores de mama y colorectales respecto a muestras de tejido sano adyacente. En el contexto celular, tanto las MNKs como el eIF4E se encuentran regulados por las cascadas de señalización celular PI3K/PTEN/AKT/mTOR, que lleva a un aumento en la actividad del eIF4E porque impide la función inhibitoria de 4E-BP1 y Ras/Raf/MAPK que aumenta la fosforilación del eIF4E por la activación de las MNKs.

El cáncer de mama es una enfermedad compleja y heterogénea en cuanto a la histología, origen celular, mutaciones, potencial metastático, progresión tumoral y respuesta terapéutica. Más de un millón de mujeres en todo el mundo son diagnosticadas de esta enfermedad cada año, con aproximadamente 400000 muertes

Objetivos

(Coughlin y Ekwueme, 2009). Actualmente, se continúa estudiando la biología molecular de esta enfermedad y se siguen desarrollando fármacos dirigidos a distintas dianas moleculares para conseguir mejores tratamientos, ya que hay pacientes que desarrollan resistencia a fármacos y en función del tipo de tumor no todos los tratamientos son válidos.

Los aptámeros son moléculas de RNA o DNA de cadena sencilla capaces de reconocer con alta afinidad y de forma específica una molécula diana. La facilidad en el aislamiento y la posibilidad de introducir modificaciones en los mismos, muestran a los aptámeros como potentes herramientas diagnósticas y terapéuticas en diferentes áreas de la biomedicina y la biotecnología. La obtención de aptámeros específicos contra MNK1b, que sean capaces de modular su actividad, supondría un avance en el estudio de la biología molecular del cáncer, que también tendría fines terapéuticos.

A la vista de estos antecedentes los objetivos planteados en este trabajo son los siguientes:

1. Estudiar el papel de MNK1b en la tumorigénesis y determinar su potencial como marcador tumoral y diana terapéutica en cáncer de mama.
2. Caracterizar los mecanismos moleculares que median en la actividad tumorigénica de MNK1b.
3. Identificar aptámeros específicos contra MNK1b y caracterizar su potencial como herramientas diagnósticas y/o terapéuticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. TUMORES DE MAMA

En el presente trabajo se han estudiado 35 tumores de mama procedentes del biobanco del Hospital Universitario Ramón y Cajal-IRYCIS, obteniéndose muestras de tejido tumoral y de tejido sano de cada paciente. A partir de los bloques de tejido congelado en criomoldes de plástico en un medio criosolidificable (OCT-Compound, Tissue-Tek) se obtuvieron, utilizando un criostato, 8-10 cortes de 20-30 μm de grosor. Las proteínas y el RNA se extrajeron del tejido utilizando 500 μL de TRIzol[®] Reagent (Gibco, Reino Unido) siguiendo las indicaciones del fabricante (**Figura 7**).

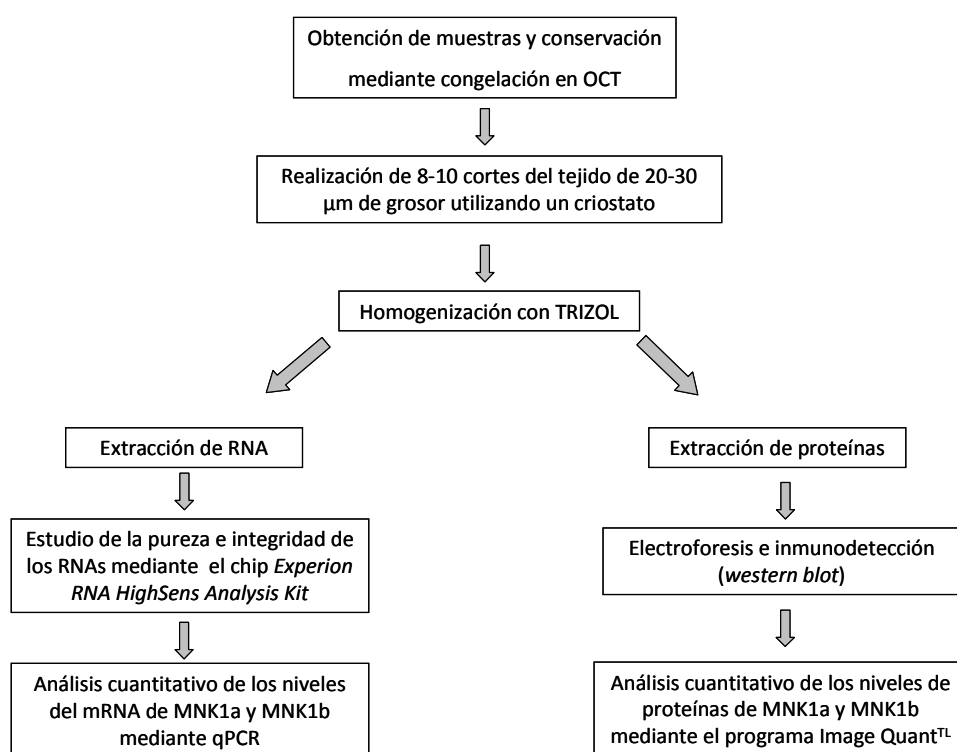


Figura 7. Procesamiento de las muestras tumorales de mama. Resumen de las distintas etapas del procesamiento de las muestras, obtención, realización de cortes, homogenización con TRIzol, extracción de RNA y de proteínas y análisis.

El RNA, tras tratarse con DNasa I para eliminar la posible contaminación con DNA, se cuantificó y se analizó su pureza e integridad utilizando el chip *Experion RNA HighSens Analysis Kit* (BIORAD, EEUU). El sedimento obtenido durante el proceso de extracción de proteínas se secó al vacío durante 5 min a temperatura ambiente, se

añadieron 50 µL de tampón de carga de electroforesis 1x, se mantuvo a 90°C durante 5 min, se centrifugó a 12000 g durante 1 min, se recuperó el sobrenadante y se congeló a -80°C hasta su utilización para análisis por *western blot* como se describe en el apartado 3.

Para el análisis cuantitativo de los niveles del mRNA de MNK1a y MNK1b en tejido sano y tumoral se realizó una RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) en un equipo iQ5 (BIORAD, EEUU) utilizando *iScript™ One-Step RT-PCR kit with SYBR® Green* (BIORAD, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se generaron dos parejas de oligonucleótidos que permiten detectar MNK1a y MNK1b (q5abMNK y q3abMNK), que hibridan con secuencias localizadas en una región común a ambas isoformas, o específicamente MNK1a (q5aMNK y q3aMNK), de modo que el q3aMNK hibrida con una secuencia que sólo aparece en la isoforma MNK1a, localizada en el exón 12, del que carece la isoforma MNK1b (**Figura 8**). En la **Tabla 4** se muestran las secuencias de las parejas de oligonucleótidos utilizadas en el estudio.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en qPCR

Nombre	Secuencia 5'- 3'
q5abMNK	AGAAACAAGCAGGGCACAGT
q3abMNK	TGCTTTTGCTTCTGGATGTG
q5aMNK	AGCATCCAGGAAGGCAAGTA
q3aMNK	GTCCCTTTTCTGGAGCTTGC
5GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
3GAPDH	GAAGATGGTGATGGGATTC
5β-actina	TGGACTTCGAGCAAGAGATG
3β-actina	GAAGGAAGGCTGGAAGAGTG
5PGK	ATGGATGAGGTGGTGAAAGC
3PGK	CTCCAGGAGCTCCAAACTG

Para analizar los genes de referencia o *housekeeping* se utilizaron las parejas de oligonucleótidos correspondientes a la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) 5GAPDH/3GAPDH y a la fosfoglicerato quinasa (PGK) 5PGK/3PGK, ya que fueron los genes control en los que se observaron menores variaciones entre muestras

de tejido tumoral y sano. La mezcla de reacción constaba de: SYBR® Green RT-PCR 2x, transcriptasa reversa *iScript*, oligonucleótidos a 300 nM, 50 ng del RNA y agua hasta completar 20 µL/tubo de volumen final.

El protocolo de PCR utilizado fue el siguiente:

Ciclo	Repeticiones	Paso	Tiempo (min)	T (°C)	T final (°C)
1	1	1	10.00	50	
2	1	1	5.00	95	
3	45	1	0.10	95	
		2	0.30	55	
4	81	1	0.30	55	95

(Melting)

Para valorar los niveles del mRNA de MNK1a, se calculó el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ siguiendo la siguiente fórmula, donde la Ct de los genes de referencia se calculó como la media de las Ct de GAPDH y PGK:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ en el tejido tumoral} - \Delta Ct \text{ en el tejido sano}$$

$$\Delta Ct \text{ en el tejido tumoral} = Ct_{MNK1a} - Ct_{\text{genes referencia}}$$

$$\Delta Ct \text{ en el tejido sano} = Ct_{MNK1a} - Ct_{\text{genes referencia}}$$

Para valorar los niveles del mRNA de MNK1b, se calculó el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ según la siguiente fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{MNK1ab} - Ct_{MNK1a})_{t. \text{ tumoral}} - (Ct_{MNK1ab} - Ct_{MNK1a})_{t. \text{ sano}}$$

Materiales y Métodos

MNK1a	ATGGTATCTTCTCAAAAGTTGGAAAAACCTATAGAGATGGGCAGTAGCGAACCCCTTCCC	60
MNK1b	ATGGTATCTTCTCAAAAGTTGGAAAAACCTATAGAGATGGGCAGTAGCGAACCCCTTCCC	60
Exón 1		
MNK1a	ATCGCAGATGGTGACAGGAGGAGGAAGAAGAAGCGAGGGGCCGGGCCACTGACTCCTTG	120
MNK1b	ATCGCAGATGGTGACAGGAGGAGGAAGAAGAAGCGAGGGGCCGGGCCACTGACTCCTTG	120
Exón 2		
MNK1a	CCAGGAAAGTTTGAAGATATGTACAAGCTGACCTCTGAATTGCTTGGAGAGGGAGCCTAT	180
MNK1b	CCAGGAAAGTTTGAAGATATGTACAAGCTGACCTCTGAATTGCTTGGAGAGGGAGCCTAT	180
Exón 3		
MNK1a	GCCAAAGTTCAAGGTGCCGTGAGCCTACAGAATGGCAAAGAGTATGCCGTCAAAATCATC	240
MNK1b	GCCAAAGTTCAAGGTGCCGTGAGCCTACAGAATGGCAAAGAGTATGCCGTCAAAATCATC	240
Exón 4		
MNK1a	CGAGAAACAGCAGGGCACAGTTCGAGAGGTGGAGACGCTGTATCAG	300
MNK1b	GAGAAACAGCAGGGCACAGTTCGAGAGGTGGAGACGCTGTATCAG	300
Exón 5		
MNK1a	TACTTGGTCTTTGAGAAATTGCAAGGAGGTTCCATCTTAGCC	420
MNK1b	TACTTGGTCTTTGAGAAATTGCAAGGAGGTTCCATCTTAGCCACATCCAGAAGCAAAAG	420
Exón 6		
MNK1a	CACCTCAATGAGCGAGAAGCCAGCCGAGTGGTGCGGGACGTTGCTGCTGCCCTTGACTTC	480
MNK1b	CACCTCAATGAGCGAGAAGCCAGCCGAGTGGTGCGGGACGTTGCTGCTGCCCTTGACTTC	480
Exón 8		
MNK1a	CTGCATACCAAAGGCATTTGCTCATCGTGATCTGAAACCAGAAAATATATTGTGTGAATCT	540
MNK1b	CTGCATACCAAAGGCATTTGCTCATCGTGATCTGAAACCAGAAAATATATTGTGTGAATCT	540
Exón 9		
MNK1a	CCAGAAAAGGTGTCTCCAGTGAAAATCTGTGACTTTGACTTGGGCAGTGGGATGAAACTG	600
MNK1b	CCAGAAAAGGTGTCTCCAGTGAAAATCTGTGACTTTGACTTGGGCAGTGGGATGAAACTG	600
Exón 10		
MNK1a	AACAACCTCCTGTACCCCATACACACAGAGCTGACCACCCCATGTGGCTCTGCAGAA	660
MNK1b	AACAACCTCCTGTACCCCATACACACAGAGCTGACCACCCCATGTGGCTCTGCAGAA	660
Exón 11		
MNK1a	TACATGGCCCCTGAGGTAGTGGAGGTCTTACGGACCAGGCCACATTCTACGACAAGCGC	720
MNK1b	TACATGGCCCCTGAGGTAGTGGAGGTCTTACGGACCAGGCCACATTCTACGACAAGCGC	720
Exón 12		
MNK1a	TGTGACCTGTGGAGCCTGGGCGTGGTCTCTACATCATGCTGAGTGGCTACCCACCCCTTC	780
MNK1b	TGTGACCTGTGGAGCCTGGGCGTGGTCTCTACATCATGCTGAGTGGCTACCCACCCCTTC	780
Exón 13		
MNK1a	GTGGGTCACTGCGGGGCCGACTGTGGCTGGGACCGGGCGAGGTCTGCAGGGTGTGCCAG	840
MNK1b	GTGGGTCACTGCGGGGCCGACTGTGGCTGGGACCGGGCGAGGTCTGCAGGGTGTGCCAG	840
Exón 14		
MNK1a	AACAAGCTGTTTGAAGCATCCAGGAAGGCAAGTATGAGTTTCTGACAAGGACTGGGCA	900
MNK1b	AACAAGCTGTTTGAAGCATCCAGGAAGGCAAGTATGAGTTTCTGACAAGGACTGGGCA	900
Exón 15		
MNK1a	CACATCTCCAGTGAAGCCAAAGACCTCATCTCCAAGCTCCTGGTGCGAGATGCAAAGCAG	960
MNK1b	CACATCTCCAGTGAAGCCAAAGACCTCATCTCCAAGCTCCTGGTGCGAGATGCAAAGCAG	960
Exón 16		
MNK1a	AGACTTAGCGCCGCCAAGTTCTGCAGCACCCATGGGTGCA	1020
MNK1b	AGACTTAGCGCCGCCAAGTTCTGCAGCACCCATGGGTGCA	1005
Exón 17		
MNK1a	GGGCAAGCTCCAGAAAAG	1080
MNK1b	GAACAGCAGCACAATGGACCTGACGCTCTTC	1036
Exón 18		
MNK1a	GCAGCTGAGCCATCGCCCTTAACCGCCAGCTATCTCAGCACGAAGAGAAGCAACTAGCA	1140
MNK1b	GCAGCTGAGCCATCGCCCTTAACCGCCAGCTATCTCAGCACGAAGAGAAGCAACTAGCA	1096
Exón 19		
MNK1a	GAGGAGCCAGAGGCACTAGCTGATGGCCTCTGCTCCATGAAGCTTTCCCTCCCTGCAAG	1200
MNK1b	GAGGAGCCAGAGGCACTAGCTGATGGCCTCTGCTCCATGAAGCTTTCCCTCCCTGCAAG	1156
Exón 20		
MNK1a	TCACGCCTGGCCCGGAGACGGGCCCTGGCCAGGCAGGCCGTGGTGAAGACAGGAGCCCG	1260
MNK1b	TCACGCCTGGCCCGGAGACGGGCCCTGGCCAGGCAGGCCGTGGTGAAGACAGGAGCCCG	1216
Exón 21		
MNK1a	CCCACAGCACTCTGA	1275
MNK1b	CCCACAGCACTCTGA	1231

Figura 8. Secuencias de MNK1a y MNK1b. Se muestran las zonas de hibridación de los oligonucleótidos q5abMNK y q3abMNK (azul) y q5aMNK y q3aMNK (verde) y el codón de terminación TGA (en recuadro rojo) que se produce en MNK1b debido al cambio en el marco de lectura por la pérdida del exón 12.

2. CULTIVOS CELULARES

2.1 LINEAS CELULARES EUCARIOTAS

Las líneas celulares utilizadas en el presente trabajo han sido las siguientes:

HEK293T (ATCC# CRL-1573TM), línea celular epitelial originada y derivada de riñón humano embrionario, que contiene el antígeno T del virus SV40 que facilita la replicación de plásmidos con el origen SV40.

MCF7 (ATCC# HTB-22TM), línea celular epitelial derivada de adenocarcinoma de mama humano. Se caracterizan por ser ER +, PR + y HER2 -.

MDA-MB-231 (ATCC# HTB-26TM), línea celular epitelial derivada de adenocarcinoma de mama humano. Se caracterizan por ser triple negativas: ER -, PR - y HER2-.

BT474 (ATCC# HTB-20TM), línea celular derivada de carcinoma ductal de mama humano. Se caracterizan por ser ER +, PR + y HER2 +.

La línea celular HEK293T se mantuvo en cultivos monocapa en frascos de 75 cm² con medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (PAA, Austria) completo, es decir, suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF) (Gibco, Reino Unido), un 1% de piruvato (Sigma-Aldrich, EEUU) y un combinado de antibióticos y antimicótico con 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 25 µg/mL de anfotericina (Sigma-Aldrich, EEUU) en un incubador con ambiente saturado de humedad a 37°C y 5% CO₂/95% O₂. Las células, en función del ensayo a realizar, se sembraron en diferentes placas a una densidad apropiada, 2x10⁴ células/pocillo para placas de 96 pocillos (p96), 1x10⁵ células/pocillo para placas de 24 pocillos (p24), 3x10⁵ células/pocillo para placas de 6 pocillos (p6) y 3x10⁶ células para placas p100.

El resto de las líneas celulares (MCF7, MDA-MB-231 y BT474) se mantuvieron en cultivos monocapa en frascos de 75 cm² con medio DMEM:Ham's F12 (PAA, Austria) 1:0.8, 1% de piruvato, 1% de glutamina (Invitrogen, EEUU), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 25 µg/mL de anfotericina y un 10% de SBF, en un incubador con ambiente saturado de humedad a 37°C y 5% CO₂/95% O₂. Estas células, en función del ensayo a realizar, se sembraron en diferentes placas a una densidad apropiada, 6x10³ células/pocillo en p96, 3x10⁴ células/pocillo en p24, 3x10⁵ células/pocillo en p6 y 2x10⁶ células en p100.

Para el levantamiento químico de las células se utilizó tripsina 1x (Gibco, Reino Unido) y para lavados celulares, PBS (tampón fosfato salino: fosfato sódico 10 mM pH 7.4, cloruro sódico 137 mM y cloruro potásico 2.7 mM) (PAA, Austria).

Para la conservación de las células, se almacenaron a -196°C en nitrógeno líquido en suero bovino fetal con un 10% (v/v) de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, EEUU) y densidad de entre 3-5x10⁶ células/mL. Los viales se descongelaron a 37°C y se centrifugaron a 400 g durante 5 min. Las células se resuspendieron en 8 mL del medio de cultivo que correspondiera según la línea celular y se sembraron en frascos de 25 cm².

2.2 TRATAMIENTOS

Las células se trataron entre 16-24 h después de haber sido sembradas. Los tratamientos se aplicaron retirando el medio de cultivo y añadiendo el compuesto diluido en el medio completo correspondiente según la línea celular, o bien adicionando a los pocillos la cantidad adecuada del compuesto sin haber retirado el medio de cultivo previamente. Los compuestos utilizados en este estudio han sido CGP57380 (Sigma-Aldrich, EEUU) a una concentración final de 20 µM u otras según ensayos, U0126 (Alexis Biochemicals, EEUU) a 50 µM, SB203580 (Alexis Biochemicals, EEUU) a 20 µM y TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) (Sigma-Aldrich, EEUU) a

100 nM. Como control se utilizó la cantidad de DMSO correspondiente al compuesto utilizado, o en el caso de que se utilizarán varias cantidades, la más alta (nunca superior al 0.1%), comprobando previamente que esta concentración de DMSO no era tóxica para las células. El tiempo de tratamiento depende del ensayo realizado y se indica en los pies de figura.

2.3 TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE CÉLULAS

A lo largo de este trabajo, las células se han transfectado con plásmidos, aptámeros y siRNAs, en distintas cantidades, que se indican en las leyendas de las figuras, en función del ensayo realizado. La transfección se llevó a cabo 16-24 h después de haber sido sembradas las células y habiendo alcanzado una confluencia en torno a un 70-80% (30-40% para las transfecciones con siRNA). Se utilizó LipofectaminaTM 2000 (Invitrogen, EEUU) según las indicaciones del fabricante y acondicionando los reactivos a cada densidad celular, tipo de placa y ensayo realizado. Para evitar que el antibiótico interfiera en la transfección, las células se lavaron dos veces con medio completo sin antibiótico. A continuación se adicionaron los complejos Lipofectamina-DNA en medio opti-MEM (Gibco, Reino Unido) y las células transfectadas se incubaron durante el tiempo adecuado hasta la realización del procesamiento correspondiente.

2.4 TRANSFECCIÓN ESTABLE DE CÉLULAS

En este estudio se generaron líneas celulares estables de MDA-MB-231. Para ello, se sembraron 2×10^6 células en cuatro placas p100. A las 16-24 h, se transfectaron las células mediante LipofectaminaTM 2000, con 10 µg/placa del DNA correspondiente (Myc-pcDNA3, Myc-pcDNA3-MNK1a y Myc-pcDNA3-MNK1b) y a una cuarta placa se le añadieron los componentes de la transfección sin DNA. Tras 24 h se retiró el medio de las placas y se añadió medio en presencia de geneticina (G418) (Gibco, Reino Unido) a 1 mg/mL. De este modo, solamente las células transfectadas sobrevivían puesto que

poseían el gen de resistencia a geneticina. La placa de células no transfectadas se utilizó como control de que la geneticina estaba haciendo efecto. Se cambió el medio con geneticina cada 2-3 días y se mantuvieron los cultivos realizando los pases necesarios. Además, se comprobó la expresión de la proteína correspondiente por inmunodetección con anticuerpos anti-Myc.

2.5 OBTENCIÓN DE LISADOS CELULARES

Para la obtención de los lisados celulares, las células se recogieron mecánicamente y se lavaron una vez con tampón A en frío [Tris-HCl 20 mM pH 7.6, ditioneitol (DTT) 1 mM, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, benzamidina 1 mM, molibdato sódico 10 mM, β -glicerofosfato sódico 10 mM, ortovanadato sódico 1 mM, cloruro potásico (KCl) 120 mM, 10 μ g/mL de antipaína y 1 μ g/mL de pepstatina A y leupeptina] centrifugándolas a 400 g durante 5 min, con la finalidad de retirar las células muertas. A continuación, las células se lisaron con el mismo tampón A en presencia de 1% tritón X-100 (Sigma-Aldrich, EEUU) y se centrifugaron a 12000 g durante 10 min. La proporción de células y tampón A con tritón utilizadas en la lisis fue de 1:2 en volumen, donde el volumen de las células es el que ocupa el sedimento tras la centrifugación. Después se recogió el sobrenadante (lisado celular), se determinó la concentración de proteínas de la muestra por el método de Bradford (Bradford, 1976), se hicieron alícuotas y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

2.6 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

2.6.1 Determinación de la viabilidad por exclusión de azul tripán

Las células (viables y no viables) se recogieron de los frascos o las placas de cultivo suspendidas en su medio correspondiente. Una alícuota de 80 μ L de las células se mezcló con 20 μ L de azul tripán (Sigma-Aldrich, EEUU). Las células se contaron

utilizando el contador TC10 (BIORAD, EEUU) considerándose como vivas aquellas que excluyen el colorante. Los resultados se expresaron como número de células vivas/mL.

2.6.2 Determinación de la reducción de las sales de tetrazolio (MTT)

Como medida de viabilidad celular se determinó la actividad de enzimas oxidoreductasas mitocondriales dependientes de NAD(P)H en las células, analizando su capacidad para reducir las sales de metiltiazol tetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, EEUU) a un producto de azul formazán (Denizot y Lang, 1986) bajo distintas condiciones experimentales. Las células fueron sembradas en placas p96 y tras haber sido transfectadas y/o tratadas, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 100 µL/pocillo de MTT a 1 mg/mL en medio de cultivo. Las placas se incubaron durante 90 min en un incubador con ambiente saturado de humedad a 37°C y 5% CO₂/95% O₂ y se adicionaron 100 µL/pocillo de una solución de lisis (10% SDS y 10 mM HCl) para la disolución de los cristales. Tras 16-24 h la reducción de MTT fue determinada por espectrofotometría en el SPECTRA FLUOR (TECAN, Suiza) a 540 nm. Los resultados son expresados como porcentaje de viabilidad con respecto al control o en unidades de absorbancia.

2.7 ENSAYOS DE FORMACIÓN DE COLONIAS

Los ensayos de formación de colonias se basan en la capacidad de una sola célula para formar una colonia, que ha de constar como mínimo de 50 células (Franken y col., 2006). Esta técnica se utiliza para determinar los efectos de agentes citotóxicos y de terapias antitumorales (Rafehi y col., 2011) permitiendo estudiar la capacidad tumorigénica de las células puesto que una de las características de las células tumorales es la pérdida de la inhibición por contacto con lo que son capaces de formar colonias.

Para la realización de estos ensayos, se sembraron 3×10^4 células/pocillo en placas p24 considerándose cada 2 pocillos un punto experimental. A las 16-24 h se efectuaron las transfecciones o se aplicaron los tratamientos correspondientes según el tipo de ensayo. Tras 16-24 h las células de cada dos pocillos se recogieron juntas, resuspendidas en el medio correspondiente, se contaron y, tras realizar las diluciones adecuadas, se resembraron 1×10^3 células/pocillo por duplicado en placas p6. Estas placas se dejaron en el incubador con ambiente saturado de humedad a 37°C y 5% CO₂/95% O₂ durante 8-9 días. Transcurrido este tiempo, las colonias se fijaron con metanol (Merck, Alemania) durante 10 min, se tiñeron con giemsa al 0.02% (Sigma-Aldrich, EEUU) durante 30 min, se lavaron con agua para eliminar restos del colorante y se dejaron secar a temperatura ambiente. Para el conteo de las colonias se utilizó un bolígrafo contador de colonias (Heathrow Scientific® LLC, Reino Unido) y una lupa (1.75X) (Bel-Art Scienceware, EEUU). Los resultados se expresaron en número de colonias y se normalizaron en porcentaje respecto al control.

A partir de las células procedentes de la siembra inicial que no fueron resembradas para los ensayos de formación de colonias, se obtuvieron lisados celulares para la comprobación mediante *western blot* de si las transfecciones o los tratamientos habían sido efectivos, así como para estudiar la fosforilación del eIF4E.

2.8 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DEL mRNA

Para la extracción de RNA total, 5×10^6 células MCF7, MDA-MB-231 y BT474, se levantaron en PBS y se centrifugaron 5 min a 400 g. El sedimento de células se resuspendió en 1 mL de TRIzol® Reagent (Gibco, Reino Unido) y se continuó el protocolo según las indicaciones del fabricante. Finalmente, se estudió la pureza e integridad de los RNAs utilizando el chip *Experion RNA HighSens Analysis Kit*.

El análisis cuantitativo de los niveles del mRNA de MNK1a y MNK1b de las líneas celulares de mama se realizó como se describe en el apartado 1. Los genes

control o *housekeeping* que se utilizaron fueron las parejas de oligonucleótidos 5GAPDH/3GAPDH y 5β-actina/3β-actina (**Tabla 4**). Los niveles del mRNA de MNK1a y MNK1b se calcularon como se describe en el apartado 1:

Para valorar los niveles del mRNA de MNK1a, se calculó el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ siguiendo la siguiente fórmula, donde la Ct de los genes de referencia se calculó como la media de las Ct de GAPDH y β-actina:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ en la línea celular} - \Delta Ct \text{ en la línea MCF7}$$

$$\Delta Ct \text{ en la línea celular} = Ct_{\text{MNK1a}} - Ct_{\text{genes referencia}}$$

Para valorar los niveles del mRNA de MNK1b, se calculó el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ según la siguiente fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{MNK1ab}} - Ct_{\text{MNK1a}})_{\text{línea celular}} - (Ct_{\text{MNK1ab}} - Ct_{\text{MNK1a}})_{\text{MCF7}}$$

2.9 OTROS ENSAYOS

2.9.1 Ensayos de afinidad de eIF4G y 4E-BP1 por el eIF4E

Los factores eIF4G y 4E-BP1 unidos al factor eIF4E se analizaron a partir de la purificación del factor eIF4E por cromatografía de afinidad a una resina con un grupo 7-metil GTP unido a sefarosaTM 4B (GE Healthcare, Reino Unido). Para ello, se incubaron 100-200 µg de lisado celular en 200 µL de tampón A con GTP 0.1 mM y 30 µL de resina al 50% en una noria durante 30 min a 4°C. Tras centrifugar a 2500 g, la resina se lavó tres veces con el tampón anterior. Por último, el análisis se realizó mediante electroforesis y transferencia (apartado 3). La detección de los diferentes factores se realizó utilizando sus respectivos anticuerpos específicos (**Tablas 5 y 6**).

Se calcularon las ratios eIF4G/eIF4E y 4E-BP1/eIF4E. Los resultados fueron expresados en porcentaje de cada muestra respecto al control.

2.9.2 Valoración de la síntesis de proteínas

La valoración de la síntesis de proteínas fue realizada midiendo la incorporación de metionina tritiada (^3H -Met). Las células MDA-MB-231 estables se sembraron en placas p24 a una densidad de 6×10^4 células/pocillo. Al cabo de 16-24 h se retiró el medio y se añadieron 250 μL /pocillo de medio que contenía 5 μCi /pocillo de ^3H -Met manteniendo la incubación a 37°C durante 1 h. Tras este tiempo los pocillos se lavaron a 4°C con 250 μL /pocillo de una disolución de L-metionina (Sigma-Aldrich, EEUU) a 1 mg/mL en PBS y posteriormente con 250 μL /pocillo de PBS. A continuación se lisaron las células añadiendo a cada pocillo 250 μL de tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 7.6, acetato potásico 10 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM y NP-40 0.25%) y se centrifugaron a 12000 g durante 30 min a 4°C . La proteína presente en el sobrenadante se precipitó en 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% durante 45 min y, posteriormente, fue filtrada utilizando filtros de fibra de vidrio GF/C Whatman (Millipore, EEUU). Los filtros se lavaron 3 veces con 2 mL de TCA al 10%. La radioactividad retenida en los filtros, correspondiente a las proteínas marcadas, fue medida en el contador de centelleo Tri-Carb 2800TR (PerkinElmer, EEUU) después de 1 h de agitación con 3.5 mL de líquido de centelleo OptiPhase HiSafe 3 (PerkinElmer, EEUU). La concentración de proteína se valoró por el método de Bradford y los resultados calculados como cpm/mg de proteína, se expresaron en porcentajes respecto al control.

3. MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

3.1 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

La electroforesis en geles de poliacrilamida se llevó a cabo mediante el empleo de un sistema de electroforesis analítica vertical de proteínas de BIO-RAD (Miniprotean II y III Cell), utilizando geles de poliacrilamida en condiciones reductoras y desnaturizantes (SDS-PAGE). Como agentes polimerizantes se utilizaron N-N-N'-N'-tetrametilen-diamina (TEMED) al 0.86% y persulfato amónico a una concentración final

de 0.45 µg/µL. La electroforesis se realizó en presencia de dodecil-sulfato-sódico (SDS) al 0.1%, utilizándose un tampón de electroforesis (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3; Glicina 192 mM y SDS al 0.1%). Las muestras se prepararon en el tampón de carga de electroforesis (Tris-HCl 180 mM, pH 6.8; 9% de SDS, 6% de β-mercaptoetanol, 15% de glicerol, 0.025% de azul de bromofenol) y se resolvieron a 200 V durante 1 h. Como marcadores de peso molecular se utilizaron *Full Range Rainbow molecular weight* (GE Healthcare, Reino Unido) y *Low Molecular Weight Calibration kit For SDS Electrophoresis* (GE Healthcare, Reino Unido). A continuación el gel fue transferido a una membrana donde se detectaron las proteínas por inmunodetección (*western blot*) o bien, fue teñido con azul de *Coomassie*.

3.2 TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS E INMUNODETECCIÓN (*Western blot*)

Las proteínas resueltas mediante electroforesis fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF). El sistema de transferencia utilizado fue un sistema continuo y húmedo en Tris-Glicina/Metanol (Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM y metanol 20% v/v; pH 8.3). La membrana de PVDF fue activada durante 1 min en metanol, lavada 3 min en agua y equilibrada 5 min en la solución de transferencia, en la que también se mojaron los papeles de transferencia y las esponjas. Sobre el soporte del cátodo se colocó una esponja, 4 papeles humedecidos, el gel, la membrana previamente activada, 4 papeles, otra esponja y el soporte del ánodo, hacia donde se desplazan las proteínas. La transferencia de proteínas se realizó a 100 V durante 1 h. Las membranas se bloquearon durante 90 min con PBS-*blotto* (o leche descremada) al 5% a temperatura ambiente, antes de incubarlas con el anticuerpo primario. Los anticuerpos fueron diluidos en PBS-*blotto* al 1% o en PBS-BSA (albúmina de suero bovino) al 1% y, en el caso de los primarios se incubaron con las membranas toda la noche a 4°C. Se utilizaron anticuerpos secundarios o proteína A conjugados con fosfatasa alcalina o bien, conjugados con peroxidasa, y se incubaron con las membranas durante 1 h a temperatura ambiente.

Materiales y Métodos

Las concentraciones y tipo de anticuerpos primarios y secundarios utilizados se encuentran detallados en las **Tablas 5 y 6**. Se utilizó Tween 20 (Sigma-Aldrich, EEUU) al 0.05% en PBS para realizar los diversos lavados, cambiar de un anticuerpo a otro y revelar.

Tabla 5. Relación de anticuerpos primarios utilizados en la determinación de proteínas.

Anticuerpo	Casa comercial	PM (kDa)	Tipo	Título
MNK1 (C-20)	Santa Cruz Biotechnology, EEUU	52	Policlonal cabra	1/500
MNK1 (M-20)	Santa Cruz Biotechnology, EEUU	52/38	Policlonal cabra	1/500
eIF4E (Ser ²⁰⁹ P)	Cell Signaling, EEUU	25	Policlonal conejo	1/1000
eIF4E	BD Biosciences, EEUU	25	Monoclonal ratón	1/2000
β-actina	Sigma Aldrich, EEUU	45	Monoclonal ratón	1/5000
GAPDH	Ambion, EEUU	38	Monoclonal ratón	1/5000
AKT (Ser ⁴⁷³ P)	Cell Signaling, EEUU	60	Monoclonal conejo	1/2000
AKT	Cell Signaling, EEUU	60	Policlonal conejo	1/1000
p38di (Thr ¹⁸⁰ /Tyr ¹⁸² P)	Sigma Aldrich, EEUU	40	Monoclonal ratón	1/2000
p38	Sigma Aldrich, EEUU	40	Policlonal conejo	1/5000
ERK1/2di (Thr ¹⁸³ /Tyr ¹⁸⁵ P)	Sigma Aldrich, EEUU	42/44	Monoclonal ratón	1/5000
ERK1/2	Sigma Aldrich, EEUU	42/44	Policlonal conejo	1/5000
4E-BP1	Cell Signaling, EEUU	18	Policlonal conejo	1/1000

c-Myc	Santa Cruz Biotechnology, EEUU		Monoclonal ratón	1/1000
Flag	Sigma Aldrich, EEUU		Monoclonal ratón	1/5000
MNK2 (S-20)	Santa Cruz Biotechnology, EEUU	52	Policlonal cabra	1/1000

Tabla 6. Relación de anticuerpos secundarios utilizados en la determinación de proteínas.

Anticuerpo/Especificidad	Casa Comercial	Título
Frente a IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina	Sigma-Aldrich, EEUU	1/3000
Proteína A conjugada con fosfatasa alcalina	Sigma-Aldrich, EEUU	1/3000
Frente a IgG de ratón conjugado con peroxidasa	GE Healthcare, Reino Unido	1/2000
Frente a IgG de conejo conjugado con peroxidasa	GE Healthcare, Reino Unido	1/2000
Frente a IgG de cabra conjugado con peroxidasa	Santa Cruz Biotechnology, EEUU	1/10000
Frente a digoxigenina conjugado con peroxidasa	Roche, Suiza	1/1000

El revelado de las membranas se realizó de dos maneras diferentes en función del anticuerpo utilizado:

- Con fosfatasa alcalina, de este modo se añadió azul de nitrotetrazolio/x-fosfato (NBT) (BIORAD, EEUU) a 30 mg/mL en N,N-dimetilformamida 70% y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) (BIORAD, EEUU) a 15 mg/mL en N,N-dimetilformamida 100%, diluidos 1/100 en tampón AP (Tris-HCl 100 mM, pH 9.5, NaCl 100 mM y MgCl₂ 5 mM).

- Con peroxidasa de rábano, mediante el empleo de un sistema de quimioluminiscencia en el que la emisión de luz es captada en una placa de rayos X (ECL *Western Blot System*).

La membrana fue reutilizada cuando se necesitó detectar la misma proteína con dos anticuerpos diferentes y también cuando se valoraron los niveles fosforilados y totales de una proteína. Para su reutilización se eliminaron el anticuerpo primario y secundario antes de proceder a la segunda inmunodetección. Esta eliminación se llevó a cabo utilizando uno de los dos procedimientos que se describen a continuación, después de comprobar cuál era el más adecuado en cada caso:

1. Incubación de la membrana 30 min a 50°C en una solución de Tris-HCl 62.5 mM pH 7.6 que contiene 2-β-mercaptoetanol 100 mM y 2% de SDS.

2. Incubación de la membrana 30 min a temperatura ambiente en solución *Re-Blot Plus Strong Solution* según las indicaciones del fabricante (Millipore, EEUU).

La cuantificación de bandas se realizó en un analizador de imágenes equipado con el programa Image Quant^{TL}. Los datos fueron obtenidos en unidades de densidad óptica/mm².

Otro modo de valorar los niveles del eIF4EP que se ha utilizado en este trabajo ha sido la utilización de un ELISA sobre las células sembradas en la placa. Para ello se ha utilizado el kit *CytoGlowTM eIF4E (Phospho-Ser209) Colorimetric Cell-Based ELISA* (Assay Biotechnology, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Con los resultados obtenidos se calculó la ratio de la absorbancia a 450 nm de las células incubadas con eIF4EP respecto a la absorbancia a 450 nm de las células incubadas con eIF4E. Los valores obtenidos se normalizaron respecto al control de transfección o al control sin transfectar según corresponda.

4. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE MNKS RECOMBINANTES

4.1 PURIFICACIÓN DE HIS-MNK1b

MNK1b, con una cola de 6 histidinas en el extremo N-terminal, se purificó a partir de lisados de bacterias *E.coli* BL21 que contienen el plásmido pDest-Mnk1b (preparado por la empresa ProAlt a partir del plásmido pcDNA3-MNK1b). Las bacterias se resuspendieron en tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 7.8; NaCl 0.5 M; imidazol 20 mM, MgCl₂ 2 mM), se añadió lisozima a una concentración final de 1 mg/mL y se incubaron en hielo durante 30 min. Posteriormente las bacterias se lisaron mediante sonicación durante 4 ciclos de 15 seg a máxima amplitud. A continuación, se centrifugaron a 10000 g durante 30 min a 4°C y se obtuvo la fracción soluble en el sobrenadante.

La proteína MNK1b presente en la fracción soluble se purificó utilizando la columna HistrapTM FF (GE Healthcare, Reino Unido) con un sistema ÄKTA prime plus (GE Healthcare, Reino Unido) y el programa His-Trap. Los lavados se realizaron con el tampón de lisis y la elución con el tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7.8; NaCl 0.5 M; imidazol 500 mM, MgCl₂ 2 mM. Las distintas fracciones se resolvieron en geles de policacrilamida, se tiñeron con el colorante azul de *Coomassie* (*Brilliant Blue R* (Sigma-Aldrich, EEUU) 0.2%, ácido acético 10% y metanol 40%. Después se destiñeron con la solución de desteñido para *Coomassie* (ácido acético al 7% y etanol al 20%) el tiempo y las veces necesarias, y después se mantuvieron en etanol al 30%. Las fracciones en las que eluye His-MNK1b (**Figura 9A**) se unieron, dializaron frente a PBS, se concentraron, se determinó su concentración por el método de Bradford, se alicuotaron y se congelaron a -80°C.

4.2 PURIFICACIÓN DE GST-MNKs

Para la expresión en bacterias y purificación de MNK1a, MNK1b, y los mutantes de delección MNK1a Δ 77 (delección de los últimos 77 aminoácidos) y MNK1 Δ Ct (delección

de los últimos 89 aminoácidos), los plásmidos pEBG6P que contienen los cDNAs correspondientes a las 4 quinasas (generosamente cedidos por el Dr. Proud, Universidad de Southampton, Reino Unido) se digirieron con las enzimas BamHI y NotI (Fermentas, Canadá) y los fragmentos obtenidos se subclonaron en el vector de expresión en bacterias pGEX-4T3. Estas construcciones, que permiten expresar las proteínas fusionadas con glutathione transferasa (GST) en el extremo N-terminal, se utilizaron para transformar bacterias Rosetta.

Para la purificación de las GST-MNKs, las bacterias se crecieron en medio LB en presencia de ampicilina a 50 µg/mL durante 16 h a 37°C y en agitación. Al día siguiente, se añadió un volumen de 2.5 mL del preinóculo a 50 mL de medio LB con la misma concentración de antibiótico y se incubó a 37°C y en agitación hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.5-0.6 a una longitud de onda de 600 nm. La inducción de la expresión de las proteínas se realizó adicionando IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) (Sigma-Aldrich, EEUU) a una concentración final de 1 mM y creciendo el cultivo en agitación. En determinadas condiciones se pueden producir agregados de proteína inactiva en la célula, denominados cuerpos de inclusión. Son frecuentes en bacterias que producen proteínas heterólogas bajo el control de promotores fuertes, y por tanto representan un problema importante en procesos biotecnológicos destinados a la producción de proteínas. Por esta razón, previamente a la purificación de las proteínas, se realizaron pruebas de tiempo de inducción con IPTG (1-4 h) y de temperatura (25 o 37°C) y se prepararon las fracciones solubles e insolubles de las bacterias (como se describe más abajo), observándose que las condiciones óptimas para la mayor recuperación de proteína en la fracción soluble fueron 1 h de inducción con IPTG a 25°C, excepto para la expresión de MNK1ΔCt en la que se utilizaron 2 h de inducción a la misma temperatura.

Las bacterias, tras la inducción con IPTG, se centrifugaron a 2000 g durante 20 min a 4°C y, tras eliminar el sobrenadante, se resuspendieron en 1.5 mL de tampón C (PBS y EDTA 1mM), se añadió lisozima a una concentración final de 1 mg/mL durante

30 min en hielo y, tras este tiempo, se añadió tritón X-100 al 0.5%. Las bacterias se lisaron mediante sonicación en 4 ciclos con pulsos de 15 seg parando 10 seg en hielo entre cada ciclo. El homogeneizado resultante se centrifugó a 10000 g durante 30 min a 4°C, obteniéndose el sobrenadante (fracción soluble) y el sedimento (fracción insoluble).

Para la purificación de las GST-MNKs, se utilizó la resina glutatión-sefarosa (GenScript, EEUU), que se equilibró con tampón C en presencia de tritón X-100 al 0.5%. Se añadieron 100 µL de resina al 50% a los sobrenadantes correspondientes a las fracciones solubles y se incubaron en agitación en una noria durante 2 h a 4°C. A continuación se centrifugaron a 5000 g durante 5 min a 4°C y se lavó la resina 3 veces con 0.5 mL de tampón C en presencia de tritón X-100 al 0.5%. La elución de la proteína se realizó añadiendo a la resina 50 µL del tampón de elución (Tris-HCl 50 mM pH 8.0 y glutatión reducido 10 mM) en agitación en una noria durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se volvió a centrifugar a 5000 g durante 5 min a 4°C y se recogió el sobrenadante que se denominó E1, se repitió el proceso añadiendo más tampón de elución para obtener el sobrenadante E2. Se realizó una electroforesis y tinción con azul de *Coomassie* para comprobar que la purificación se había producido correctamente (**Figura 9B**).

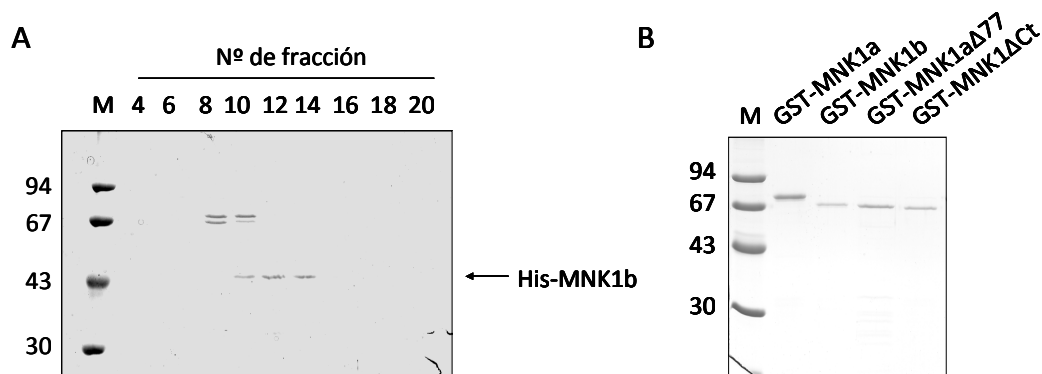


Figura 9. Purificaciones de MNKs recombinantes. (A) Gel de poliacrilamida teñido con azul de *Coomassie* correspondiente a las distintas fracciones de la purificación de His-MNK1b. (B) Gel de poliacrilamida teñido con azul de *Coomassie* correspondiente a las purificaciones de GST-MNKs. M: marcador de peso molecular

5. SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE APTÁMEROS

5.1 SELECCIÓN *IN VITRO* (SELEX)

Para el inicio de las rondas de selección, se utilizó una librería de oligonucleótidos de DNA de cadena sencilla, denominada RND40, formada por moléculas diferentes con 40 nucleótidos centrales de secuencia aleatoria flanqueada por dos regiones de 18 nucleótidos de secuencia conocida. En la selección, 2 nmol de la librería fueron desnaturalizados durante 10 min a 90°C en un volumen de 200 µL de tampón de aptámeros (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, KCl 5 mM), y se mantuvo a 4°C durante 10 min para promover la formación de las estructuras terciarias de la hebra de DNA. La proteína diana His-MNK1b (3.9 µg, 100 pmol) se incubó con el RND40 durante 1 h a 37°C en agitación. Para la purificación de los complejos aptámero-proteína se añadieron a la mezcla 20 µL de resina Ni-NTA agarosa (Qiagen, Alemania) en un volumen final de 200 µL en tampón de aptámeros, y se incubó durante 1 h a 4°C en noria. Después se realizaron 3 lavados con 1 mL de tampón de aptámeros centrifugando a 12000 g durante 10 min y los complejos MNK1b:aptámero se resuspendieron en 20 µL de agua y se incubaron a 90°C durante 5 min, para separar los aptámeros de la proteína, tras lo que se volvieron a centrifugar y se recuperó el sobrenadante. Las secuencias de DNA monocatenarias que se encontraban en el sobrenadante anterior, se amplificaron mediante PCR en el termociclador iQ5 con los cebadores denominados F3 (5'-GCG GAT GAA GAC TGG TGT-3') y R3 (5'-GTT GCT CGT ATT TAG GGC-3') a 0.8 µM cada uno, dNTPs a 200 µM, 2 mM de MgCl₂ y 2 U de Taq Polimerasa (Biotools, España), en tampón PCR 1x en un volumen final de 50 µL. El programa que se utilizó en la PCR fue el siguiente:

95°C	2 minutos	1 ciclo
95°C	30 segundos	15 ciclos
56°C	30 segundos	
72°C	30 segundos	
72°C	5 minutos	1 ciclo

El esquema general de este proceso de selección se muestra en la **Figura 10**. Para llevar a cabo una nueva ronda de selección se utilizó 1 nmol (25 µg) del producto de PCR de la ronda anterior, y se repitió todo el proceso descrito anteriormente. Para favorecer la selección, a partir de la ronda 5, la población de aptámeros y His-MNK1b se incubaron durante 30 min a 37°C, en lugar de 1 h. A lo largo de las rondas, para comprobar si la amplificación del aptámero se había efectuado correctamente, se realizaron electroforesis en geles de 2.5% agarosa (Sigma-Aldrich, EEUU) en tampón TAE 1x (Tris-HCl 40 mM pH 7.4, ácido acético 0.112% y EDTA 1 mM) y una dilución 1/10000 de Gel Red (Biotium, EEUU), que se intercala entre las cadenas de DNA y permite observar las bandas cuando el gel es expuesto a la luz ultravioleta en un analizador de geles. Las muestras se cargaron en tampón de carga (Fermentas, Canadá) acompañadas del marcador de peso molecular pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) (Fermentas, Canadá). Las electroforesis se desarrollaron en el mismo tampón del gel, a un voltaje constante de 100 V durante 1 h.

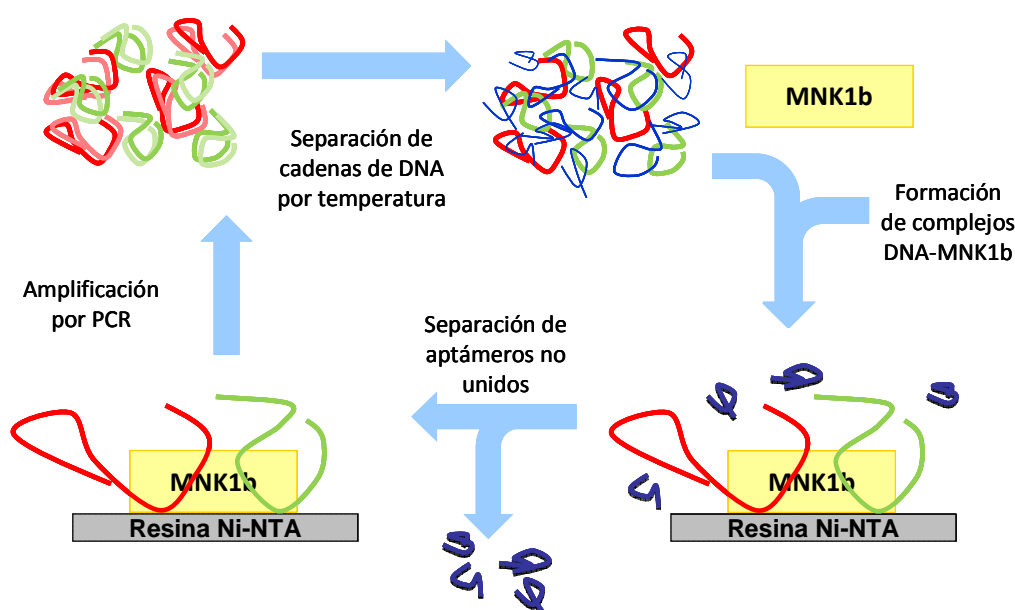


Figura 10. Esquema general del proceso SELEX.

Los ácidos nucleicos resultantes de cada amplificación se precipitaron con 0.1 v/v de acetato sódico 3 M y 2.5 v/v de etanol absoluto frío durante 1 h a -80°C, o

durante una noche a -20°C. Transcurrido este tiempo, la mezcla se centrifugó a 12000 g durante 15 min y el sedimento obtenido se lavó con 100 µL de etanol al 70%. Se realizó otra centrifugación en las mismas condiciones, se retiró el sobrenadante y se eliminaron los restos de etanol a temperatura ambiente. El sedimento se resuspendió en 25 µL de agua y se cuantificó en el nanodrop NanoPhotometerTM (IMPLEN, Alemania).

Con el objetivo de evitar que se seleccionaran aptámeros frente a la resina Ni-NTA que se estaba utilizando, se realizó una contraselección. Para ello, 1 nmol de la población de aptámeros obtenida después de las rondas 4, 7 y 10, se incubó con 20 µL de resina Ni-NTA agarosa en tampón de aptámeros durante 1 h a 4°C y en noria. Después se centrifugó a 12000 g durante 10 min y se recogió el sobrenadante, donde se encontraban aquellos aptámeros que teóricamente reconocían MNK1b y no reconocían la resina Ni-NTA. Con la ronda correspondiente contraseleccionada se continuó el proceso de selección.

5.2 CLONAJE DE LOS APTÁMEROS Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Con la finalidad de obtener aptámeros individuales, las poblaciones de las rondas 7 y 10 se clonaron en el plásmido pGEM[®]-T (Promega, EEUU). La reacción de ligación se optimizó a una relación molar 3:1 (aptámero:vector) en un volumen de reacción de 10 µL, con 3 U de la enzima T4 DNA ligasa (Promega, EEUU), en tampón T4 DNA ligasa. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 1 h, o bien toda la noche a 4°C. La mezcla de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes *E.coli* JM109 (Promega, EEUU) y las colonias fueron analizadas mediante PCR para la identificación de los clones positivos y su aislamiento.

Una vez identificados los aptámeros y sus secuencias correspondientes mediante el clonaje y la secuenciación, se utilizó el programa informático Mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>), que permite predecir las estructuras secundarias más estables en base a su energía libre. Además, se estudió la

capacidad de los aptámeros de formar estructuras G-cuádruplex mediante el análisis de las secuencias utilizando el programa QGRS Mapper (<http://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/analyze.php>).

5.3 MARCAJE DE APTÁMEROS Y TRATAMIENTO CON EXONUCLEASA

Las poblaciones de aptámeros y los clones individuales se marcaron en sus extremos mediante PCR utilizando las parejas de oligonucleótidos 5'-dig-F3 y 5'-P-R3 y 5'-P-F3 y 5'-dig-R3. Puesto que el producto de la PCR es de doble cadena, se eliminó la cadena marcada con P en posición 3'. Para ello se utilizó la enzima Lambda exonucleasa (New England BioLabs, Reino Unido), de modo que para un volumen final de 50 µL se utilizó 1 U de enzima y 5 µL del tampón de la enzima. La mezcla se incubó a 37°C durante 30 min y, posteriormente, a 70°C durante 10 min para la inactivación de la exonucleasa. Para la recuperación de las cadenas sencillas se precipitaron las mezclas, como se describe en el apartado 5.1.

5.4 ENSAYO ENZIMÁTICO EN PLACA CON APTÁMEROS (ELONA)

La técnica ELONA (*Enzyme-Linked OligoNucleotide Assay*) es un ensayo cuantitativo basado en la interacción entre la molécula diana y el oligonucleótido conjugado a una enzima, cuya actividad es capaz de generar productos detectables por colorimetría o fluorescencia. Según el objetivo planteado y la información que se desea obtener se realizaron distintas combinaciones de aptámeros o proteínas, manteniendo el mismo protocolo de actuación.

Esta técnica se llevó a cabo para estudiar qué poblaciones o aptámeros reconocían mejor a la proteína diana y para ensayos de afinidad y especificidad. Para ello, se añadieron 200 ng de proteína/pocillo diluida en solución *coating* (KPL, EEUU) (200 µL/pocillo) a una placa de ELISA de 96 pocillos *Maxisorp Nunc* (Thermo Scientific, Dinamarca). La placa se incubó toda la noche a 4°C y en agitación. Al día siguiente se

retiró el contenido de los pocillos, para eliminar el exceso de proteína no unida a la placa, y se añadieron 200 μ L/pocillo de PBS-BSA 5%. La placa se incubó a 37°C durante 1 h y con agitación para bloquear y evitar uniones inespecíficas. Después se hicieron 4 lavados con tampón de aptámeros con BSA al 0.2%, utilizando un sistema lavador de placas Hydro Flex (TECAN, Suiza). A continuación, se incubó la proteína dispuesta en la placa con los aptámeros que se analizaron, a la concentración que correspondiera según el ensayo y en un volumen final de 200 μ L/pocillo de tampón de aptámeros sin BSA durante 1 h a 37°C con agitación. Todos los aptámeros utilizados, ya fueran poblaciones o clones, estaban marcados con digoxigenina o biotina y habían sido previamente desnaturalizados a 90°C durante 10 min y posteriormente mantenidos a 4°C durante 10 min. Transcurrido el periodo de incubación, el exceso de DNA no unido se eliminó con 4 lavados con el tampón de aptámeros igual que anteriormente. Para la detección de la unión del aptámero a la proteína, se añadieron 200 μ L de anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa (Roche, Suiza) o estreptavidina-peroxidasa (GE Healthcare, Reino Unido) diluidos 1/1000 en tampón de aptámeros a 37°C durante 1 h en agitación. Para la eliminación del exceso de anticuerpo, se realizaron 4 lavados con tampón de aptámeros. Para el revelado de la placa se añadieron 100 μ L/pocillo de solución ABTS (Roche, Suiza) y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente adquiriendo medidas a una longitud de onda de 405 nm cada 10 min en un espectrofotómetro SPECTRA FLUOR (TECAN, Suiza).

5.5 ANÁLISIS DE LOS COMPLEJOS APTÁMERO-DIANA POR PCR A TIEMPO REAL

Otro método, alternativo al ELONA, para determinar la afinidad de los aptámeros por MNK1b es la cuantificación de los aptámeros capaces de unirse a complejos resina-MNK1b por PCR cuantitativa. Los complejos se obtuvieron incubando His-MNK1b con la resina Ni-NTA agarosa durante 1 h a 4°C en una noria. Una vez obtenidos los complejos, se incubaron 10 μ L/tubo de la resina Ni-NTA acomplejada con MNK1b (200 ng/tubo, 5 pmol/tubo) con 2 μ g (80 pmol) de aptámero durante 30 min a 37°C con agitación. En paralelo se incubaron la misma cantidad de cada aptámero con

10 μL /tubo de la resina Ni-NTA sin MNK1b. Tras centrifugar a 12000 g 10 min, se lavaron 3 veces con 250 μL de tampón de aptámeros y, finalmente, la resina se resuspendió en 20 μL de agua, se incubó a 90°C durante 10 min y se realizó el análisis cuantitativo mediante qPCR. Se utilizó el kit SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Takara, Japón) siguiendo las indicaciones del fabricante, en un equipo iQ5 y los oligonucleótidos F3 y R3. La mezcla de reacción constaba de: SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 1x, oligonucleótidos a 0.2 μM , 1 μL de molde y agua hasta completar 20 μL /tubo de volumen final. El protocolo de PCR que se utilizó fue:

Ciclo	Repeticiones	Paso	Tiempo (min)	T(°C)	T final (°C)
1	1	1	0.30	95	
2	25	1	0.05	95	
		2	0.20	55	
		3	0.15	72	
3	1	1	1.00	72	
4	81	1	0.30	55	95

(Melting)

5.6 MEDIDA DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE LOS APTÁMEROS

Para determinar la entrada de los aptámeros dentro de las células, así como su vida media en el citoplasma, las células MDA-MB-231 que fueron transfectadas con los aptámeros, fueron levantadas y centrifugadas, lavadas con PBS y, finalmente, lisadas en 35 μL de agua durante 5 min. Posteriormente, los lisados se incubaron a 90°C durante 10 min y se centrifugaron a 12000 g durante 10 min tras lo que se recogió el sobrenadante y se realizó la qPCR. En este caso, se utilizó *QUANTIMIX EASY KIT* (Biotools, España) siguiendo las indicaciones del fabricante, en un equipo iQ5 y los oligonucleótidos F3 y R3. La mezcla de reacción constaba de: *Quantimix Easy master*

mix 1x, oligonucleótidos a 0.2 μ M, 1 μ L de molde y agua hasta completar 20 μ L/tubo de volumen final. El protocolo de PCR que se utilizó fue:

Ciclo	Repeticiones	Paso	Tiempo (min)	T(°C)	T final (°C)
1	1	1	2.00	95	
2	25	1	0.05	95	
		2	0.20	55	
		3	0.20	72	
3	1	1	1.00	72	
4	81	1	0.30	55	95

(*Melting*)

Para cuantificar las cantidades de aptámeros en el interior celular, se hizo una recta patrón con cantidades conocidas de cada uno de los aptámeros entre 100 fmol y 10 amol.

6. ENSAYOS DE ACTIVIDAD MNK QUINASA

Los ensayos quinasa realizados con las MNKs purificadas a partir de bacterias, obtenidas como se explica en el apartado 4, mostraron que estas proteínas no eran funcionales. En consecuencia, para valorar la actividad quinasa de MNK1a se ha utilizado una proteína quinasa comercial GST-MNK1a T385D recombinante y activada (BPS Bioscience, EEUU), y para valorar la actividad de MNK1b se han utilizado inmunoprecipitados de lisados de células que sobreexpresaban Myc-MNK1b.

Para analizar el efecto de los aptámeros, en los ensayos con GST-MNK1a T385D, se realizó una preincubación de la quinasa con los aptámeros con el fin de dar tiempo a que se produzca la interacción. Para ello, en el ensayo se añadieron 0.25 μ g/tubo de GST-MNK1 T385D, 3 μ L/tubo de tampón quinasa 10x (Tris-HCl 200 mM, pH

7.5; KCl 0.5 M y MgCl_2 100 mM) y 6 pmol/tubo (0.2 μM) de aptámeros diluidos en tampón de aptámeros sin BSA. La preincubación se realizó a 30°C y en agitación (350 rpm) durante 5 min. Después se adicionaron el péptido sustrato de quinasas RRRSSLRA (200 μM) (AnaSpec EGT Group, EEUU), que se ha descrito que es sustrato de MNK1a (Konicek y col., 2011), 100 μM de ATP frío (Sigma-Aldrich, EEUU) y 1 μCi de [γ - ^{32}P] ATP (Hartmann Analytic, Alemania). El volumen final de la reacción fue de 30 μL y tras 30 min de incubación con agitación, se paró la reacción pipeteando 10 μL por duplicado sobre papeles de cromatografía Whatman P81 (GE Healthcare, Reino Unido), que se sumergieron en una solución de ácido fosfórico al 1%. Con esto se procedió a lavar todo el [γ - ^{32}P] ATP en exceso que no había sido incorporado en la reacción. Todos los papeles se lavaron 3 veces durante 10 min con ácido fosfórico al 1% y tras la adición de 3.5 mL de líquido de centelleo OptiPhase HiSafe 3 se cuantificaron en un contador de centelleo Tri-Carb 2800TR. Los resultados obtenidos en cpm se expresaron en porcentajes normalizados respecto al control correspondiente.

Para valorar la actividad quinasas de MNK1b se utilizaron inmunoprecipitados de lisados de células HEK293T que sobreexpresan Myc-MNK1b, con el fin de obtener la proteína que posteriormente se usó en ensayos de actividad quinasas. Los lisados (1.6 mg) se incubaron en presencia de fluoruro sódico 10.5 mM (NaF), 3.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de BSA y 30 μL de Ab-anti-myc en un volumen final de 1 mL durante 2 h en una noria a 4°C. Después se añadieron 100 μL de la resina proteína G sefarosa al 50% (GE Healthcare, Reino Unido) previamente equilibrada con tampón A, a cada tubo y se incubaron durante 1 h en una noria a 4°C. Posteriormente, se hicieron 3 lavados con 1 mL/tubo de tampón A centrifugando a 2000 g durante 5 min, un lavado con 1 mL/tubo de cloruro de litio (LiCl) 0.5 M y 2 lavados con tampón quinasas 1x Tris-HCl (20 mM pH 7.5; KCl 50 mM y MgCl_2 10 mM). En el penúltimo lavado, se separaron 10 μL que se emplearon para comprobar por *western blot* que la inmunoprecipitación se había producido correctamente. Los inmunoprecipitados (1/10) se preincubaron con 6 pmol/tubo (0.2 μM) de los distintos aptámeros como se describe anteriormente

durante 5 min y tras la adición del péptido sustrato RRRLSSLRA (200 μ M), 100 μ M de ATP frío (Sigma-Aldrich, EEUU) y 1 μ Ci de [γ - 32 P] ATP la incubación se mantuvo durante 1 h, tras la cual se paró la reacción pipeteando 10 μ L por duplicado sobre papeles de cromatografía Whatman P81, siguiendo el mismo protocolo que anteriormente. Los resultados se expresaron en porcentajes normalizados respecto al control correspondiente.

7. INMUNOCITOQUÍMICA Y APTACITOQUÍMICA

La inmunocitoquímica (ICQ) es una técnica que posibilita la localización microscópica de las proteínas presentes en las células. Se decidió utilizar los aptámeros conjugados comercialmente en el extremo 5' con Alexa-488 (IBA, Alemania), para que pudieran ser detectados en el microscopio, con el fin de estudiar su capacidad de unión a la diana en las células.

Para la realización de esta técnica, las células MDA-MB-231 estables se sembraron a una densidad de 4×10^4 células/pocillo en placas p24 sobre cubres de cristal previamente tratados con poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich, EEUU). Tras 16-24 h, las células se fijaron con metanol frío durante 20 min a -20°C , se lavaron tres veces con PBS y se bloquearon con SBF diluido al 10% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Tras un nuevo lavado con PBS, se incubaron con 2 pmol/cubre de aptámero conjugado con Alexa-488 diluido en tampón de aptámeros con BSA al 0.2% durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron tres veces con PBS y se añadió el anticuerpo primario correspondiente diluido en SBF al 10% (MNK1 (C-20) 1/50 o MNK1 (M-20) 1/25) durante toda la noche a 4°C y en oscuridad. Tras la incubación, se lavaron las células con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario frente a IgG de cabra conjugado con rodamina 1/200 (Jackson, EEUU) diluido en SBF al 10% durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. En el ensayo en el que se utilizaron células MDA-MB-231 transfectadas transitoriamente con el plásmido pcDNA3-Flag-MNK1b, se utilizó como anticuerpo primario Flag 1/3000 y un

secundario frente a IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 568 (Invitrogen, EEUU) 1/300, ambos diluidos en SBF al 10%. Finalmente, se lavaron las células con PBS y agua y se montaron en portaobjetos de vidrio utilizando tampón con glicerol, p-fenilendiamina y bis-benzamida 30 μ M (Hoechst 33342).

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos se expresaron como la media \pm error estándar de la media (SEM). Para determinar si las diferencias entre los distintos grupos son o no significativas, se ha utilizado el análisis de la varianza (ANOVA) y cuando este análisis fue significativo, se ha utilizado el post-test Tukey's. Para determinar si la media de una muestra difiere significativamente del valor control se utilizó la Prueba T-test para una muestra. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa informático GraphPad Prism[®], versión 4.0 (San Diego, EEUU). La significación estadística se expresó como: * o c, $p < 0.05$ (significativo); ** o b, $p < 0.01$ (muy significativo); *** o a, $p < 0.001$ (altamente significativo).

Para analizar la relación entre la expresión de MNK1b y los subtipos moleculares se utilizó la prueba chi-cuadrado, utilizando el programa informático SPSS 19.0.

9. MATERIALES

Análisis de imagen: Image Quant^{TL} (GE Healthcare, Reino Unido)

Analizador de geles: Minibis Pro (DNR Bio-Imaging Systems, Israel)

Centrífugas: B4i/BR4i Jouan de DJB (Labcare, Reino Unido), microfuga Mini-Spin[®] (Eppendorf, Alemania), Beckman J2-HS (Beckman Coulter, Alemania)

Criostato: MICROM HM 550 (Thermo Fisher Scientific, EEUU)

Equipo para el revelado fotográfico: Fuji Photo Film CO.LTD.

Escáner: Perfection 2450 (Epson, Japón)

Membranas de transferencia: PVDF Hybond-P (GE Healthcare, Reino Unido)

Método de revelado: ECLTM y ECL-Advance (GE Healthcare, Reino Unido); Supersignal[®] (Pierce, EEUU); ClarityTM Western ECL Substrate (BIORAD, EEUU); Sustrato BCIP y NBT (BIORAD, EEUU)

Microscopio: Nikon Eclipse Ti acoplado a un módulo confocal Nikon C1 (Nikon, Japón)

Otros productos: desoxinucleótidos, sales, ácidos y bases inorgánicas, solventes orgánicos, detergentes, agarosa, reactivos etc fueron suministrados por las siguientes casas comerciales: Panreac, Sigma, Merck y BIORAD

Papel de transferencia: Munktell (GE Healthcare, Reino Unido)

Películas fotográficas: de sensibilidad normal, Fuji Medical X-Ray Film (Fujifilm, Japón); hipersensibles Amersham Hyper-filmTM ECL (GE Healthcare, Reino Unido).

Productos radiactivos: [γ -³²P] ATP AE 3000 Ci/mmol (Hartmann Analytic, Alemania) y [³H]-Met AE 82.1 Ci/mmol (PerkinElmer, EEUU)

La procedencia del resto de los materiales se detalla en el texto.

RESULTADOS

1. PAPEL DE MNK1a y MNK1b EN LA PROGRESIÓN TUMORAL EN CÁNCER DE MAMA

1.1 EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS MNK1a Y MNK1b EN TUMORES DE MAMA

Uno de los objetivos de este trabajo es estudiar el papel de las quinasas MNK1a y MNK1b en la tumorigénesis y su potencial como dianas terapéuticas. En un primer abordaje experimental, se analizó la expresión de MNK1a y MNK1b, y la expresión y fosforilación del eIF4E en tumores de mama y su correlación con los distintos tipos tumorales.

Se estudiaron 35 muestras, depositadas en el Biobanco del Hospital Universitario Ramón y Cajal-IRYCIS, procedentes de tumores de pacientes, mujeres, diagnosticadas de cáncer de mama y sus correspondientes controles de tejido sano adyacente. En función de la expresión de determinados marcadores, las muestras se clasificaron en los 4 subtipos moleculares de modo que 8 pertenecían al subtipo luminal A (LA), 9 al luminal B (LB), 8 al HER2 y 10 al triple negativo (TN) (**Tabla 7**).

A partir de las muestras se obtuvieron extractos totales de proteína y RNA como se indica en el apartado 1 de Materiales y Métodos. La inmunodetección de las proteínas se realizó mediante electroforesis (SDS-PAGE), transferencia a membranas de PVDF e incubación con anticuerpos específicos contra eIF4EP, eIF4E y MNK1. Por otro lado, se realizó un análisis cuantitativo de la expresión de los mRNAs mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) utilizando como molde el RNA procedente de tejido tumoral y sano de las muestras.

Tabla 7. Muestras estudiadas de tumores de mama.

Nº de muestra	Subtipo molecular ¹	Receptor de estrogenos	Receptor de progesterona	Receptor HER2	Ki-67
2	HER2	Negativo	Negativo	Positivo	Alto > 15%
3	LA	Positivo	Positivo	Negativo	Bajo<15%
4	LB	Positivo	Positivo	Negativo	Alto>15%
8	LA	Positivo	Positivo	Negativo	Bajo<15%
9	LB	Positivo	Positivo	Negativo	Alto>15%
10	LB	Positivo	Negativo	Negativo	Alto>15%
11	LB	Positivo	Negativo	Negativo	Alto>15%
12	HER2	Negativo	Negativo	Positivo	Alto>15%
17	TN	Negativo	Negativo	Negativo	Alto>15%
18	LB	Positivo	Negativo	Positivo	Bajo<15%
19	LA	Positivo	Positivo	Negativo	Bajo<15%
21	TN	Negativo	Negativo	Negativo	Bajo<15%
22	LB	Positivo	Positivo	Positivo	Alto>15%
38	LA	Positivo	Positivo	Negativo	Bajo<15%
39	LA	Positivo	Positivo	Negativo	Bajo<15%
40	HER2	Negativo	Negativo	Positivo	Alto>15%
41	LA	Positivo	Positivo	Negativo	Bajo<15%
42	LB	Positivo	Positivo	Negativo	Alto>15%
43	LB	Positivo	Positivo	Negativo	Alto>15%
44	LA	Positivo	Positivo	Negativo	Bajo<15%
45	LB	Positivo	Negativo	Positivo	No valorable
46	LA	Positivo	Positivo	Negativo	Bajo<15%
47	HER2	Negativo	Negativo	Positivo	Alto>15%
48	TN	Negativo	Negativo	Negativo	Alto>15%
57	TN	Negativo	Negativo	Negativo	Alto>15%
61	TN	Negativo	Negativo	Negativo	Alto>15%
63	HER2	Negativo	Negativo	Positivo	Alto>15%
64	HER2	Negativo	Negativo	Positivo	Alto>15%
65	TN	Negativo	Negativo	Negativo	Bajo<15%
66	TN	Negativo	Negativo	Negativo	Alto>15%
67	TN	Negativo	Negativo	Negativo	Alto>15%
68	TN	Negativo	Negativo	Negativo	Alto>15%
69	HER2	Negativo	Negativo	Positivo	Alto>15%
70	HER2	Negativo	Negativo	Positivo	Alto>15%
71	TN	Negativo	Negativo	Negativo	Alto>15%

¹ Subtipos moleculares: LA (ER+ y/o PR+ HER2-), LB (ER+ y/o PR+ HER2-/+) , HER2 (ER- PR- HER2+) y TN (ER- PR- HER2-).

Los niveles de MNK1a en los distintos tumores se analizaron con un anticuerpo generado contra el extremo C-terminal de MNK1a (MNK1(C-20)), que solamente reconoce MNK1a y no MNK1b, como se describe en el apartado 3 de Materiales y Métodos, y se calculó la ratio entre tejido tumoral y tejido sano (**Figura 11A**). El

subtipo molecular LA es el único en el cual hay un aumento significativo en los niveles de MNK1a en tejido tumoral respecto al sano siendo su valor medio 3.1, mientras que en los demás subtipos los niveles de MNK1a no varían (**Figura 11B**).

Para valorar los niveles de MNK1b se utilizó un anticuerpo generado contra el extremo N-terminal de MNK1 (MNK1 (M-20)) capaz de reconocer tanto MNK1a como MNK1b, y se calculó, como anteriormente, la ratio entre tejido tumoral y sano. Como se muestra en la **Figura 11A**, en muchos casos (17 de las 35 muestras estudiadas) MNK1b no era detectable en el tejido control por lo que se decidió realizar un análisis cualitativo. Para realizar esta valoración, se asignó el valor de 0 a aquellos casos en los que no hay cambios en los niveles de expresión de MNK1b entre tejido tumoral y sano o en los que no se detecta la proteína en tejido tumoral, y el valor de 1 en los que se observa un aumento en la expresión de MNK1b en tejido tumoral respecto al tejido sano o en los que sólo se detecta MNK1b en tejido tumoral. En este análisis se observa que existen diferencias significativas entre LA y TN (ambos HER2 negativo), en los que más del 75% de los tumores sobreexpresan MNK1b, y los subtipos LB y HER2, en los que estos tumores representan un 41.2% (**Figura 11C**). Cuando se agrupan los casos en función de la expresión de HER2, existe una correlación significativa entre las muestras MNK1b positivo y HER2 negativo (Prueba Chi-cuadrado, $p=0.035$).

Se realizó un análisis cuantitativo de la expresión de los mRNAs de MNK1a y MNK1b. Para ello se utilizó el RNA de aquellas muestras que presentaban valores más altos y similares entre tejido control y tumoral del factor RQI (índice de calidad del RNA) agrupándolas en dos grupos, HER2 negativo y HER2 positivo. Tras llevar a cabo la RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR), se cuantificó la expresión de los mRNAs de MNK1a y MNK1b en tejido tumoral y sano adyacente como se describe en el apartado 1 de Materiales y Métodos.

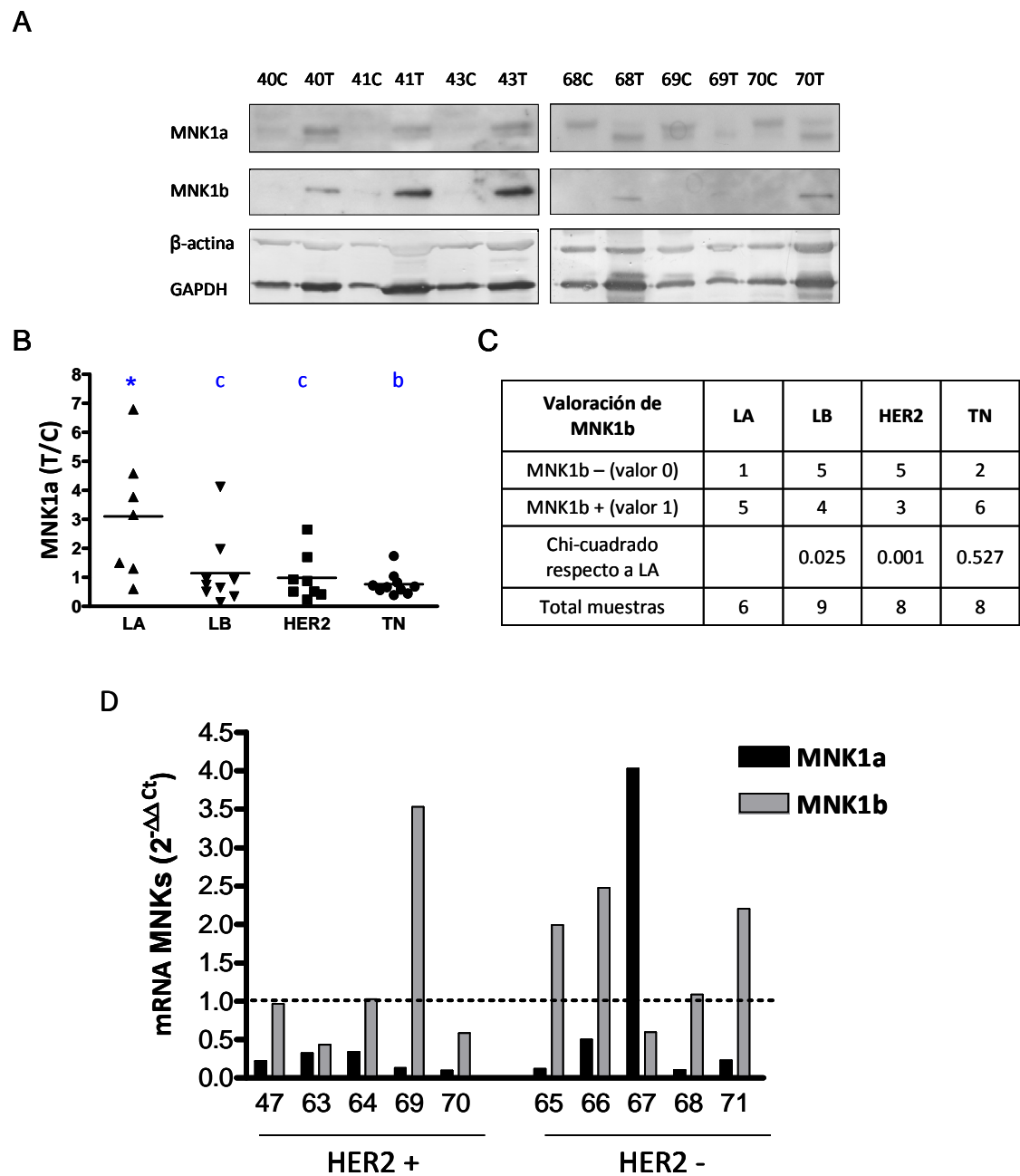


Figura 11. Expresión y niveles del mRNA de MNK1a y MNK1b en tumores de mama. (A) Inmunodetección de MNK1a y MNK1b (SDS-PAGE 12%) en muestras de tumores de mama. La β -actina y GAPDH se utilizaron como controles de carga. Se indica el número de muestra y el tipo molecular. (C) tejido sano; (T) tejido tumoral. **(B)** Cuantificación de los niveles de MNK1a de las muestras normalizados frente a β -actina y GAPDH y expresados como la ratio de T/C. La línea horizontal representa la media de cada subtipo molecular. (* $p < 0.05$ respecto a 1; c $p < 0.05$ y b $p < 0.01$ respecto a LA). **(C)** Valoración cualitativa de MNK1b asignando el valor de 0 a aquellos casos en los que no hay cambios en los niveles de expresión de MNK1b entre tejido tumoral y sano o en aquellos en los que no se detecta la proteína en tejido tumoral, y el valor de 1 en los que se observa un aumento en la expresión de MNK1b en tejido tumoral respecto al tejido sano o en los que sólo se detecta MNK1b en tejido tumoral. **(D)** Cuantificación de los niveles de los mRNAs de MNK1a y MNK1b como se describe en Materiales y Métodos. Los datos se expresan como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Como se observa en la **Figura 11D**, los resultados muestran que en el grupo HER2 positivo, los niveles del mRNA de MNK1a disminuyen en el tejido tumoral en los 5 casos analizados, mientras que el mRNA de MNK1b aumenta más de 3 veces en uno de ellos sin observarse cambios en el resto. En el grupo HER2 negativo, los niveles del mRNA de MNK1a también disminuyen en el tejido tumoral excepto en un caso, mientras que los niveles del mRNA de MNK1b aumentan en 3 de los 5 casos analizados. Por tanto, se puede concluir que los niveles del mRNA de MNK1b tienden a ser más altos en tejido tumoral respecto al sano en los tumores HER2 negativo, lo que está de acuerdo con los datos obtenidos al analizar la expresión de la proteína.

Como se menciona en la introducción, el factor eIF4E es el sustrato mejor caracterizado de las MNKs habiéndose descrito un aumento de su expresión y de su fosforilación en cáncer. En este trabajo, se han analizado los niveles y el grado de fosforilación del eIF4E como se describe en el apartado 3 de Materiales y Métodos, y se ha calculado la ratio entre el tejido tumoral y sano (**Figura 12A**). Tanto los niveles como el grado de fosforilación del eIF4E aumentan significativamente en el tejido tumoral respecto al sano (2.39 ± 0.28 veces, $p < 0.0001$ y 1.57 ± 0.02 veces, $p = 0.02$, respectivamente). Cuando se consideran los casos analizados agrupados según su subtipo molecular, los niveles del eIF4E aumentan en los subtipos LA, LB y HER2, mientras que en el caso de los TN, aunque el valor medio es superior a 2, el incremento no es estadísticamente significativo (**Figura 12B**). Por otra parte, la fosforilación del eIF4E no varía en los subtipos LA, LB y HER2 pero sí lo hace en el subtipo TN, cuyo valor medio es superior a 2 (**Figura 12C**). No se observan diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los dos parámetros entre los distintos subtipos moleculares.

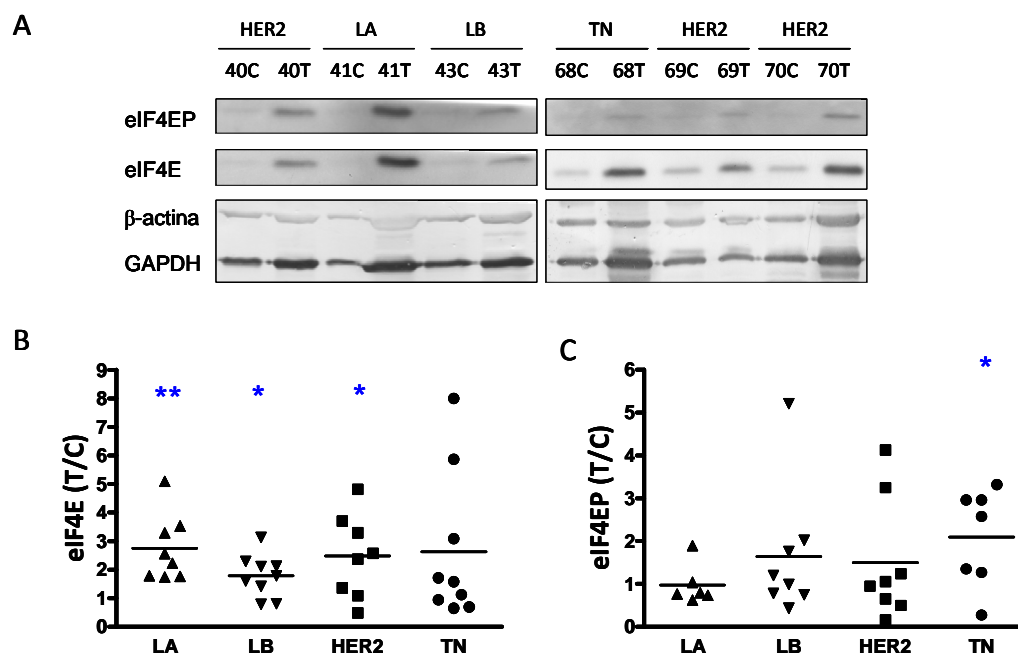


Figura 12. Expresión y fosforilación del eIF4E en tumores de mama. Se obtuvieron los extractos de proteínas de los cortes de tejido tumoral y sano. **(A)** Niveles totales y fosforilados del eIF4E de muestras representativas (SDS-PAGE 12% e inmunodetección). **(B)** Cuantificación de los niveles del eIF4E respecto a β -actina y GAPDH expresados como la ratio T/C **(C)** Cuantificación de los niveles del eIF4EP respecto a los del eIF4E expresados como la ratio T/C (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ respecto a 1).

1.2 ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS PROTEÍNAS MNK1a Y MNK1b EN LÍNEAS CELULARES DE MAMA

1.2.1 Expresión de MNK1a y MNK1b y fosforilación del eIF4E

A la vista de los resultados mostrados en el apartado 1.1, se decidió estudiar el papel de las dos isoformas de MNK1 en 3 líneas celulares de cáncer de mama (MCF7, MDA-MB-231 y BT474), que representan a los subtipos moleculares LA, TN y LB, respectivamente. Para ello, se analizaron la expresión de MNK1a y MNK1b, así como los niveles y el grado de fosforilación del eIF4E, en estas tres líneas celulares.

Se obtuvieron lisados celulares de las tres líneas de mama, como se describe en el apartado 2.5 de de Materiales y Métodos, en los que se analizaron los niveles de MNK1a y MNK1b mediante inmunodetección con los anticuerpos específicos. Los

resultados del análisis densitométrico de las bandas muestran que las células MDA-MB-231 presentan niveles de MNK1a significativamente menores que las células MCF7 y BT474 (**Figura 13A**), mientras que, por otra parte, las células BT474 son las que presentan niveles menores de MNK1b (**Figura 13B**).

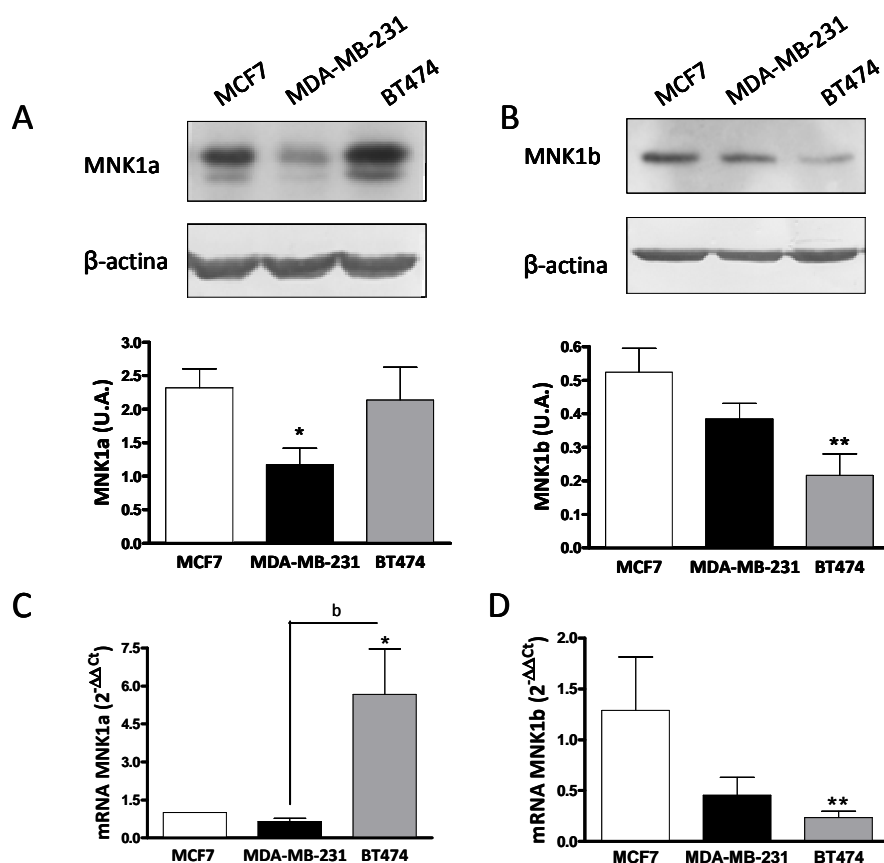


Figura 13. Expresión y niveles de los mRNAs de MNK1a y MNK1b en líneas celulares de mama. Inmunodetección (SDS-PAGE 12%) de MNK1a (**A**) y MNK1b (**B**) en células MCF7, MDA-MB-231 y BT474. Los valores obtenidos de la cuantificación de las bandas se normalizaron respecto a los de β-actina, que se utilizó como control de carga. Las barras representan la media \pm SEM de 5-11 experimentos independientes. Cuantificación de los niveles de mRNA de MNK1a (**C**) y MNK1b (**D**) mediante qRT-PCR como se describe en Materiales y Métodos. Los datos se expresan como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y representan la media \pm SEM de 3-4 experimentos independientes. (*p<0.05, **p<0.01 respecto a las células MCF7 y b p<0.01 entre los grupos señalados).

Para confirmar si los cambios en la expresión de las dos proteínas son debidos a diferencias en los niveles del mRNA, se llevó a cabo un análisis cuantitativo de la expresión de dichos mRNAs mediante qRT-PCR, como se indica en el apartado 2.8 de Materiales y Métodos. Los resultados muestran que los niveles del mRNA de MNK1a son significativamente más altos en las células BT474 respecto a las otras dos líneas

Resultados

celulares (**Figura 13C**), mientras que los de MNK1b son significativamente más bajos en esta línea celular (**Figura 13D**). Las células MCF7 y MDA-MB-231 presentan niveles similares del mRNA de MNK1a, y la línea MCF7 muestra niveles superiores del mRNA de MNK1b a los de la línea MDA-MB-231. Estos datos indican que existe una correlación entre los niveles de los mRNAs y la expresión de las proteínas, excepto en el caso de MNK1a en las células MCF7.

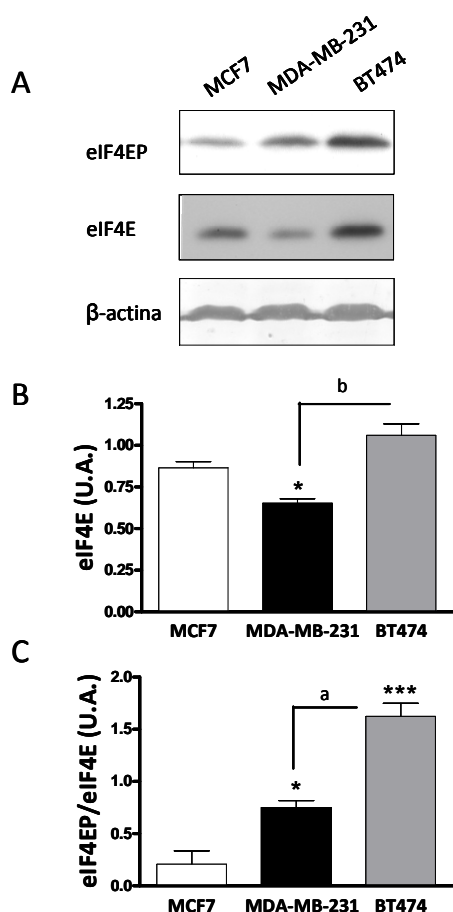


Figura 14. Expresión y fosforilación del eIF4E en líneas celulares de mama. Se utilizaron lisados celulares de las líneas celulares de mama. **(A)** Niveles del eIF4E y eIF4EP (SDS-PAGE 12% e inmunodetección). La β -actina se utilizó como control de carga. **(B)** Cuantificación de los niveles del eIF4E respecto a los de β -actina. Las barras representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. **(C)** Cuantificación de los niveles del eIF4EP respecto a los del eIF4E. Las barras representan la media \pm SEM de 4 experimentos independientes (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ respecto a las células MCF7 y b $p < 0.01$, a $p < 0.001$ entre los grupos señalados).

El estudio de la expresión y fosforilación del eIF4E se realizó por inmunodetección con anticuerpos específicos frente al eIF4E y al eIF4EP (**Figura 14A**). Los datos indican que los niveles del eIF4E en la línea celular MDA-MB-231 son significativamente más bajos que en las otras dos líneas (**Figura 14B**). Por otra parte, las células MCF7 son las que presentan un grado de fosforilación del eIF4E significativamente menor, mientras que las BT474 presentan los niveles más altos (**Figura 14C**). El estudio de todos estos resultados permite concluir que no existe una

correlación directa entre los niveles de las dos isoformas de MNK1 y la fosforilación de su sustrato eIF4E en estas líneas celulares.

1.2.2 Estudio de las vías de señalización celular

La fosforilación del eIF4E se regula tanto por la activación de las proteínas quinasas MNKs, a través de la vía de señalización MAPK, como por la disponibilidad del eIF4E para unirse al eIF4G, regulado por las proteínas inhibitorias 4E-BPs a través de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR como se muestra en la **Figura 15** y se explica en el apartado 1.3 de la Introducción.

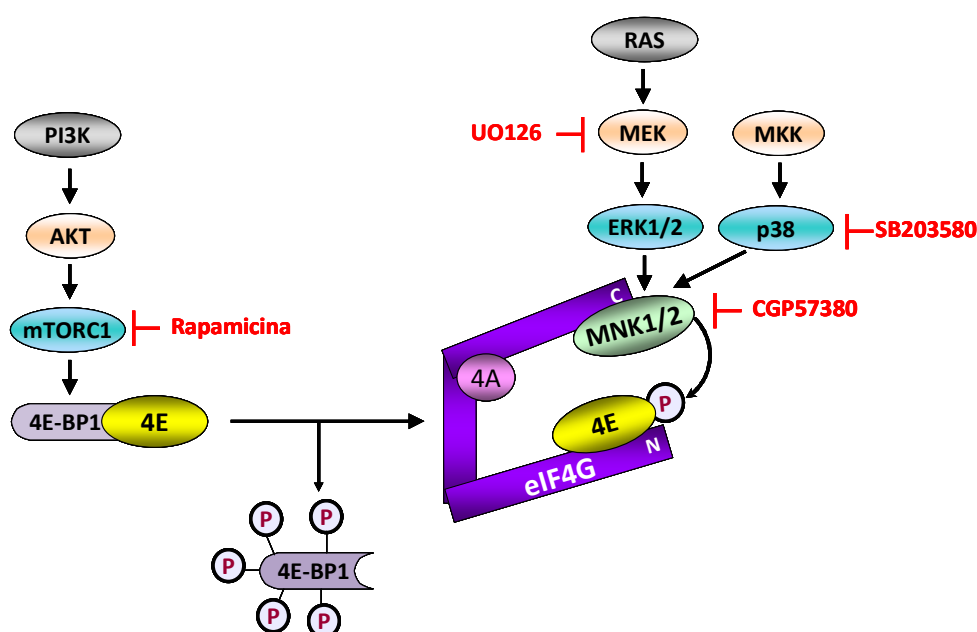


Figura 15. Vías de señalización celular que regulan la fosforilación del eIF4E. Esquema general donde se muestran las cascadas de señalización de MAPK y PI3K/AKT/mTOR, así como los inhibidores de algunas de las proteínas implicadas.

Con el objetivo de identificar el mecanismo responsable de las diferencias en el estado de fosforilación del eIF4E entre las distintas líneas de mama, se decidió estudiar las vías de señalización celular PI3K/AKT/mTOR y MAPK, así como la actividad de 4E-BP1. Para abordar este estudio se determinó la activación de AKT, p38 y ERK1 y 2 mediante inmunodetección con anticuerpos fosfoespecíficos. Los resultados de estos

Resultados

ensayos muestran que las células BT474 son las que presentan una mayor fosforilación de AKT, en relación con las otras dos líneas celulares. Las células MDA-MB-231 tienen aproximadamente 9 veces más AKT fosforilado que las células MCF7 (**Figura 16A**). Por otra parte, los resultados indican que la fosforilación de p38 es visiblemente mayor en las células MDA-MB-231 mientras que la línea BT474 presenta una fosforilación de esta proteína significativamente más baja (**Figura 16B**). El análisis de la fosforilación de ERK1/2 muestra que los niveles de ERK2P son prácticamente indetectables (**Figura 16C**) mientras que, como en el caso de p38, la mayor fosforilación de ERK1 se produce en las células MDA-MB-231 y la línea celular BT474 es la que presenta la fosforilación más baja.

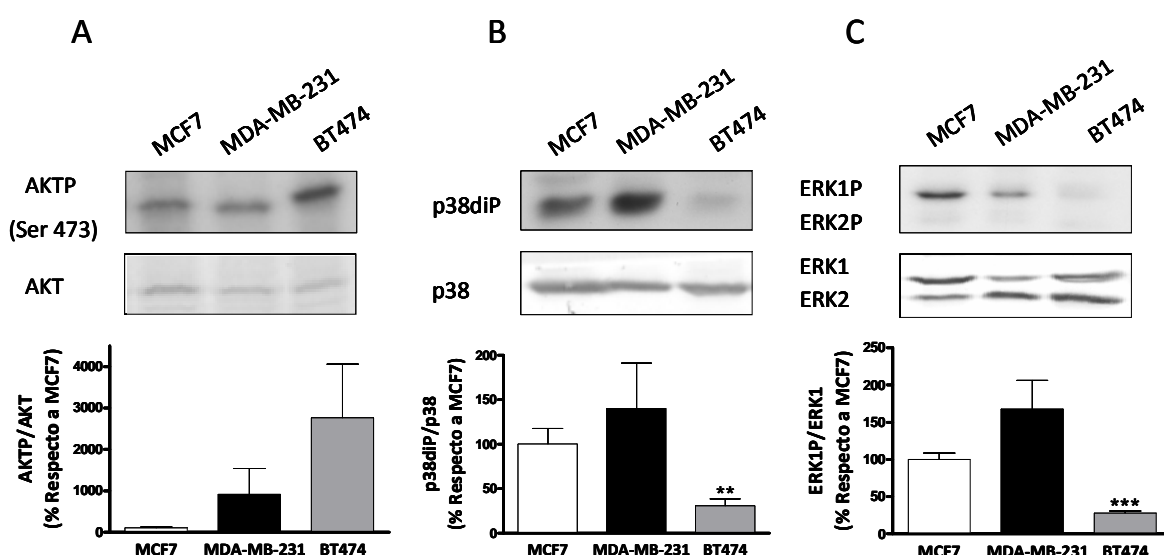


Figura 16. Análisis de las vías de señalización celular en líneas celulares de mama. Inmunodetección (SDS-PAGE 12%) y cuantificación de los niveles de AKTP (Ser 473)/AKT (**A**), p38diP/p38 (**B**) y ERK1P/ERK1 (**C**) como se indica en Materiales y Métodos. Los valores obtenidos se normalizaron respecto a los de las células MCF7 y las barras representan la media \pm SEM de al menos 4 experimentos independientes (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecto a las células MCF7).

En resumen, los resultados sugieren que las diferencias observadas en la fosforilación del eIF4E entre las tres líneas celulares estudiadas podrían ser debidas a la activación de distintas cascadas de señalización. Así, la línea MCF7 tiene activadas las vías de las MAPK, las células MDA-MB-231 presentan una activación tanto de la vía

PI3K/AKT/mTOR como de las de las MAPK y las células BT474 sólo tienen activa la vía PI3K/AKT/mTOR.

Para estudiar la asociación del eIF4E con su proteína de unión, 4E-BP1, que refleja la cantidad del eIF4E que no puede formar parte del complejo eIF4F, se realizaron ensayos de purificación por cromatografía de afinidad del eIF4E con la resina m^7 -GTP-sefarosa y se cuantificaron las proteínas por inmunodetección como se muestra en el apartado 2.9.1 de Materiales y Métodos. En la **Figura 17A** se observa que los niveles de 4E-BP1 unidos al eIF4E en las células BT474 disminuyen significativamente respecto a los de las células MCF7 y MDA-MB-231. Además, cuando se analizan los niveles de 4E-BP1 de las tres líneas celulares, se observa que las células BT474 presentan niveles de 4E-BP1 significativamente menores a los determinados en las otras dos líneas (**Figura 17B**).

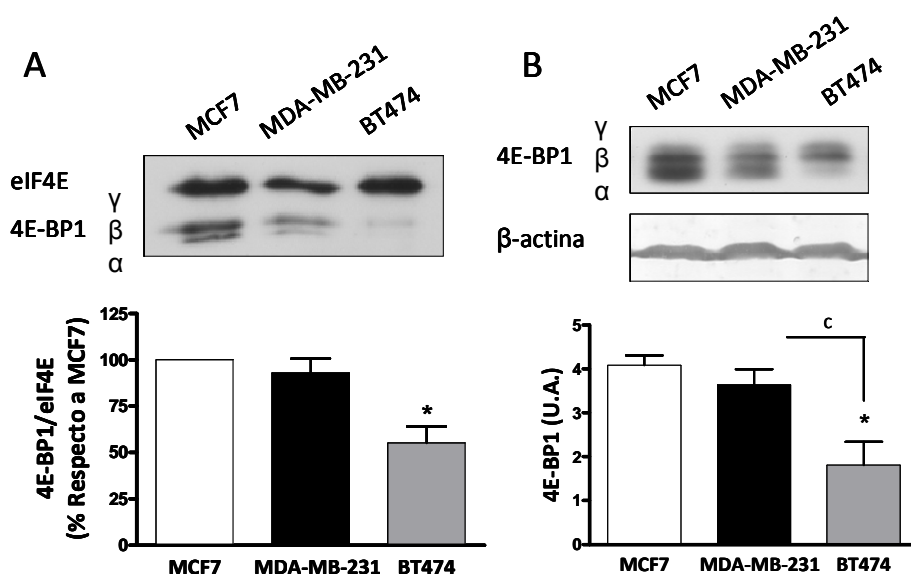


Figura 17. Complejos 4E-BP1/eIF4E y niveles de 4E-BP1 en líneas celulares de mama. (A) Los lisados fueron incubados con m^7 -GTP-sefarosa y las proteínas unidas resueltas mediante SDS-PAGE 15% e inmunodetectadas con anticuerpos específicos. A partir de la cuantificación de las bandas, se calculó la ratio 4E-BP1/eIF4E y los datos se normalizaron frente a los de MCF7. (B) Inmunodetección (SDS-PAGE 15%) y cuantificación de 4E-BP1. Los valores obtenidos se normalizaron respecto a los de β -actina y se expresan en unidades arbitrarias (U.A.). Las barras representan la media \pm SEM de 3-5 experimentos independientes (* $p < 0.05$ respecto a las células MCF7 y c $p < 0.05$ entre los grupos señalados).

Resultados

La menor formación de complejo 4E-BP1/eIF4E en las células BT474 sugiere que hay una mayor cantidad del eIF4E disponible para formar parte del complejo eIF4F y, en consecuencia, poder ser fosforilado por las quinasas. Este resultado podría explicar los mayores niveles de fosforilación del eIF4E observados en esta línea (**Figura 14C**).

1.2.3 Análisis del papel de MNK1 en la viabilidad de las líneas celulares de mama.

Las células tumorales se caracterizan, entre otras cosas, por una desregulación de las vías de señalización celular, lo que produce una división y proliferación descontroladas. En primer lugar, se determinó el número de células vivas y la actividad MTT de las tres líneas celulares de mama (MCF7, MDA-MB-231 y BT474) 72 h después de su siembra. Como se puede observar en la **Figura 18A**, las células MDA-MB-231 presentan mayor número de células vivas que el resto (3.1 veces más que las MCF7 y 3.7 veces más que las BT474) y una actividad MTT significativamente superior a las otras dos líneas, mientras que las células BT474 son las que presentan una actividad MTT menor (**Figura 18B**).

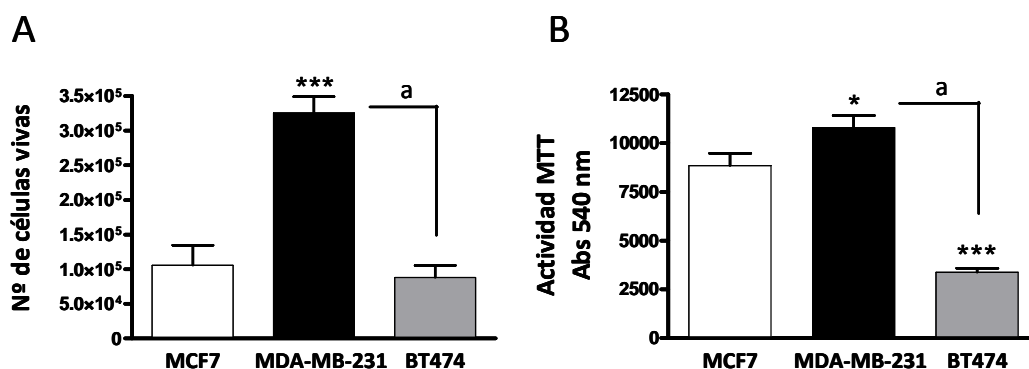


Figura 18. Contaje y actividad MTT de las líneas celulares de mama (A) Las células se sembraron en placas p24 a una densidad de 3×10^4 células/pocillo. Al cabo de 72 h las células se tripsinizaron y contaron utilizando azul tripán. Las barras representan la media \pm SEM de 6 experimentos independientes. **(B)** Las células se sembraron en placas p96 a una densidad de 1×10^4 células/pocillo y tras 72 h se realizaron ensayos de actividad MTT. Las barras representan la media \pm SEM de 11 experimentos independientes. (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ respecto a las células MCF7 y a $p < 0.001$ entre los grupos señalados).

A continuación, se trató de determinar el efecto de distintos inhibidores de las MNKs sobre la viabilidad en las tres líneas celulares. Para ello, las células se trataron con los inhibidores de las MAPK SB203580 (inhibidor de p38) y U0126 (que inhibe a MEK, por lo que anula la activación de ERK1/2), y el inhibidor específico de las MNKs, CGP57380. Los resultados obtenidos tras 72 h de tratamiento muestran que el inhibidor CGP57380 disminuye significativamente la actividad MTT en las células MCF7 y MDA-MB-231, mientras que no afecta significativamente a las células BT474. Por su parte, SB203580 inhibe la actividad MTT más de un 20% en las células MCF7 y BT474, mientras que no afecta a las células MDA-MB-231. Por último, el inhibidor U0126 disminuye significativamente la actividad MTT en las tres líneas celulares (**Figura 19**).

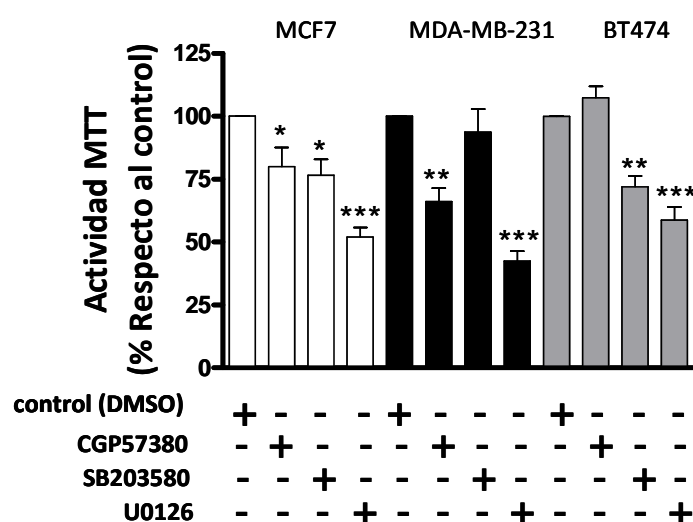


Figura 19. Efecto de los inhibidores sobre la actividad MTT. Las células se sembraron en placas p96 a una densidad de 1×10^4 células/pocillo. Al cabo de 16-24 h se trataron con CGP57380 a 20 μ M, SB203580 a 20 μ M y U0126 a 50 μ M durante 72 h, tras las cuales se realizaron ensayos de actividad MTT. Las barras representan la media \pm SEM de 6 experimentos independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecto al control).

Resultados

Se estudió el efecto de los inhibidores sobre la fosforilación del eIF4E mediante inmunodetección con anticuerpos contra eIF4E y eIF4EP. Los resultados muestran que la fosforilación del eIF4E disminuye en presencia de los inhibidores CGP57380 (60-87% de inhibición) y U0126 (15-29% de inhibición), pero aumenta con SB203580 (22-44% de aumento) (**Figura 20**).

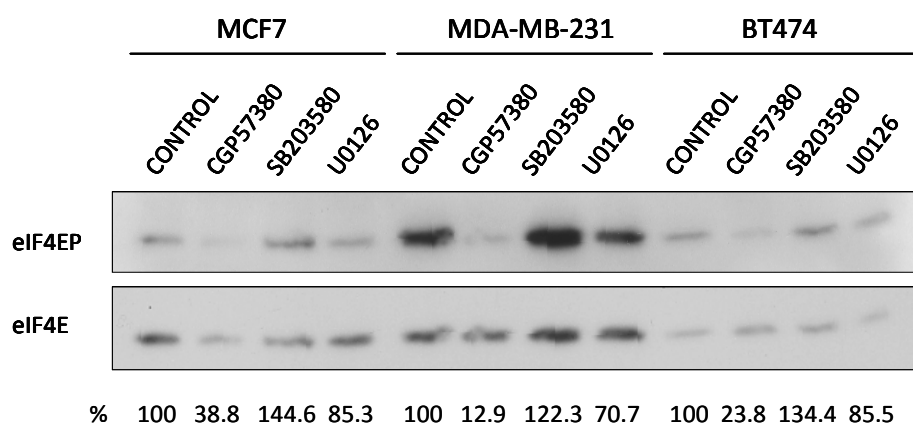


Figura 20. Efecto de los inhibidores sobre la fosforilación del eIF4E. Lisados de células previamente tratadas con DMSO al 0.1%, CGP57380 a 20 μ M, SB203580 a 20 μ M y U0126 a 50 μ M durante 4 h, fueron resueltos en SDS-PAGE 10% y analizados por inmunodetección utilizando anticuerpos específicos. Se indican los valores en porcentaje de las medias normalizadas respecto al control en cada línea celular y se muestra un *western blot* representativo de 2 experimentos.

El hecho de que las células MDA-MB-231 sean las más sensibles al CGP57380 puede ser debido a que sus niveles de MNK1a son más bajos que los de las otras dos líneas estudiadas (**Figura 13A**). Con objeto de comprobar esta hipótesis, se realizaron ensayos de actividad MTT con células MDA-MB-231 previamente transfectadas con plásmidos que contienen el gen MNK1a o MNK1b (**Figura 21A**). Los resultados de estos experimentos muestran que la sobreexpresión de las MNKs no revierte el efecto del inhibidor sobre la actividad MTT (**Figura 21B**). Resultó interesante que, en ausencia del inhibidor, la sobreexpresión de MNK1a o MNK1b incrementa la actividad MTT (20.3% y 34.4%, respectivamente), aunque no de forma significativa. Este resultado sugiere que las MNKs estimulan la proliferación celular.

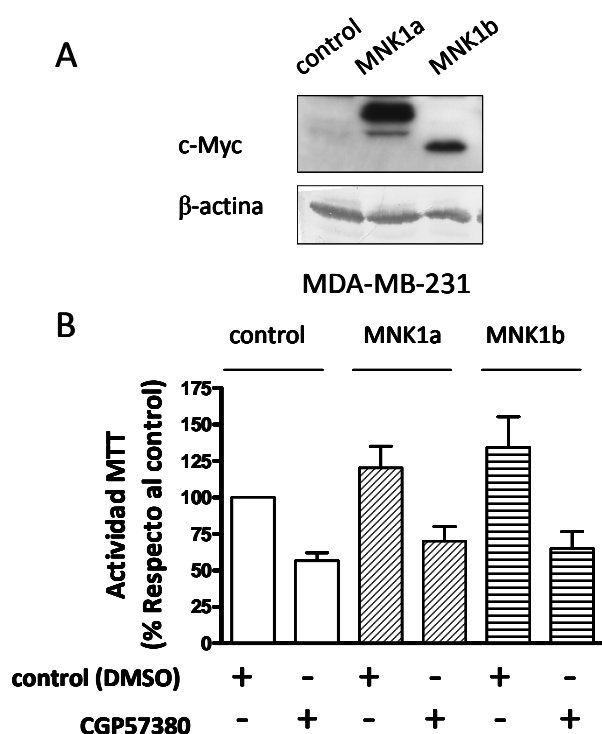


Figura 21. Efecto del CGP57380 sobre la actividad MTT de MDA-MB-231. (A) Las células MDA-MB-231 se sembraron en placas p6 a una densidad de 7.5×10^4 células/pocillo. Al cabo de 16-24 h se transfectaron transitoriamente con Myc pcDNA3 (control), Myc MNK1a (MNK1a) y Myc MNK1b (MNK1b) durante 16-24 h tras lo que se obtuvieron lisados celulares que fueron resueltos en SDS-PAGE 12% y analizados por inmunodetección. (B) Las células MDA-MB-231 previamente transfectadas transitoriamente con Myc pcDNA3, Myc MNK1a y Myc MNK1b se trataron con DMSO al 0.1% o CGP57380 a 20 μ M durante 72 h tras las cuales se realizaron ensayos de actividad MTT. Los datos obtenidos se normalizaron respecto a los de Myc pcDNA3 + DMSO y las barras representan la media \pm SEM de al menos 4 experimentos independientes.

Puesto que la eficiencia de la transfección de las células MDA-MB-231 usando lipofectamina es relativamente baja y podría estar amortiguando las diferencias observadas en los ensayos anteriores, se generaron líneas MDA-MB-231 estables que expresan MNK1a (MDA-MB-231 MNK1a) o MNK1b (MDA-MB-231 MNK1b), como se indica en el apartado 2.4 de Materiales y Métodos. En primer lugar, se valoraron los niveles de expresión de ambas isoformas, comprobándose que las células estables sobreexpresan las quinasas (**Figura 22A**). Además, las células MDA-MB-231 MNK1a presentan niveles del eIF4EP significativamente mayores que los de las MDA-MB-231 control, mientras que no hay cambios significativos en los niveles del eIF4EP en las células MDA-MB-231 MNK1b (**Figura 22B**). A continuación, se realizaron ensayos de actividad MTT que mostraron que las células MDA-MB-231 MNK1a presentaban una actividad un 21.1% mayor que las células control, aunque esta diferencia no era estadísticamente significativa (**Figura 22C**). Por último, con objeto de estudiar si la sobreexpresión de las MNKs afecta a la síntesis de proteínas en las líneas estables, se realizaron ensayos de incorporación de metionina tritiada observándose que la sobreexpresión de MNK1a aumenta la síntesis de proteínas de forma significativa (**Figura 22D**).

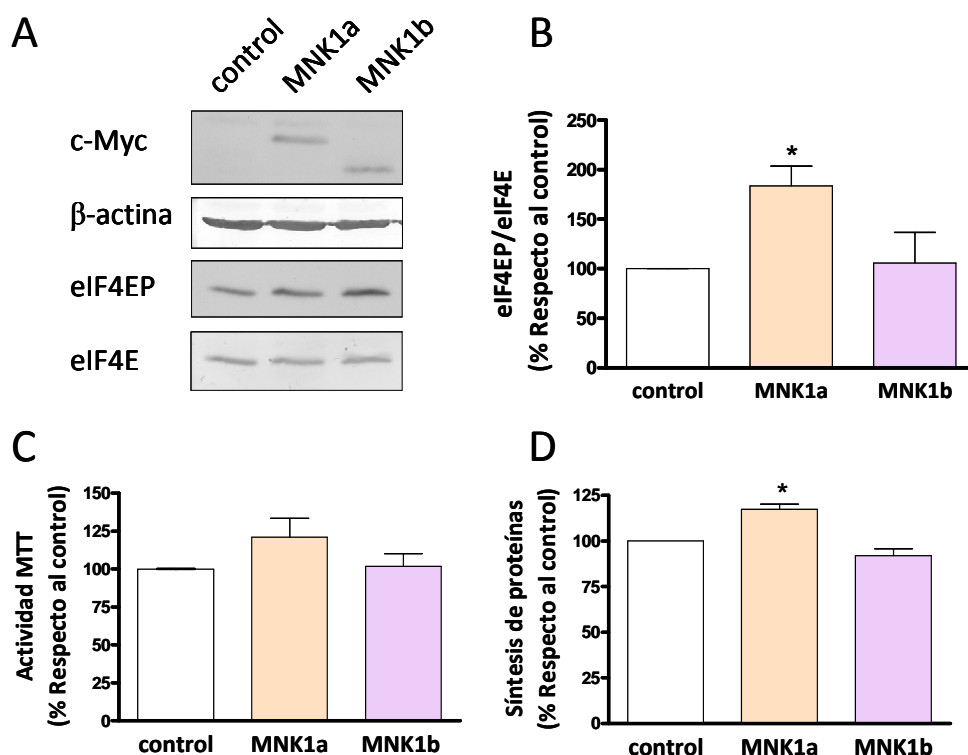


Figura 22. Caracterización de las líneas MDA-MB-231 estables. **(A)** Lisados de células MDA-MB-231 transfectadas de manera estable con Myc pcDNA3 (control), Myc MNK1a (MNK1a) y Myc MNK1b (MNK1b) fueron sometidos a SDS-PAGE 12% e inmunodetección utilizando anticuerpos anti-Myc, β-actina, eIF4EP y eIF4E. **(B)** Cuantificación de los niveles del eIF4EP respecto a los del eIF4E. **(C)** Las células MDA-MB-231 estables se sembraron en placas p96 a una densidad de 6×10^3 células/pocillo y tras 72 h se realizaron ensayos de actividad MTT. **(D)** Las células MDA-MB-231 estables se sembraron en placa p24 a una densidad de 6×10^4 células/pocillo y tras 16-24 h se midió la incorporación de H^3 -Met, como se indica en Materiales y Métodos. Los datos obtenidos se normalizaron respecto a los de las células MDA-MB-231 control y las barras representan la media \pm SEM de 4-9 experimentos independientes (* $p < 0.05$ respecto al control).

Finalmente, para determinar si la sobreexpresión de las MNKs revierte el efecto del CGP57380 sobre la actividad MTT, se llevaron a cabo ensayos en los que las células MDA-MB-231 estables fueron tratadas con concentraciones crecientes de CGP57380 (1, 5, 10, 20 y 40 μ M) observándose que a una concentración de 40 μ M las células MDA-MB-231 control presentan una actividad MTT del 34.6%, que es significativamente menor que la de las células que sobreexpresan MNK1a o MNK1b, siendo del 54 y 44.4%, respectivamente a la misma concentración (**Figura 23**). Debido a que a concentraciones más altas del inhibidor el DMSO utilizado como vehículo

produce un efecto tóxico, no se ha podido evaluar si las diferencias observadas podrían ser aún mayores.

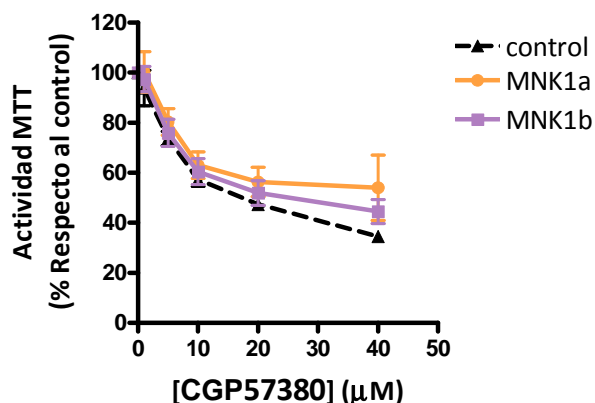


Figura 23. Efecto del CGP57380 sobre la actividad MTT de las células MDA-MB-231 estables. Las células se sembraron en placas p96 a una densidad de 6×10^3 células/pocillo. Al cabo de 16-24 h se trataron con CGP57380 a 1, 5, 10, 20 y 40 μM . Tras 72 h de tratamiento se evaluó la actividad MTT. Los datos se expresan como porcentaje respecto a las células tratadas con DMSO. La gráfica representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes.

1.2.4 Análisis del papel de MNK1 en la capacidad clonogénica de las líneas celulares de mama

Con el fin de evaluar la capacidad clonogénica (capacidad de una célula de proliferar a una colonia de células genéticamente idénticas) de las distintas líneas celulares, se llevaron a cabo ensayos de formación de colonias a distinta densidad celular, como se describe en el apartado 2.7 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos mostraban que las células MCF7 y MDA-MB-231 son capaces de formar colonias claramente definidas, de al menos 50 células cada una, la mayoría de ellas separadas unas de otras y, en consecuencia, cuantificables. Sin embargo, en las células BT474 se observaban colonias muy pequeñas y de aspecto difuso, por lo que no se pudo utilizar esta línea en estos ensayos. A partir de la cuantificación de las colonias, se calculó el porcentaje de colonias formadas respecto al número de células sembradas (PE, *Plating efficiency*), obteniéndose un valor de $3.33 \pm 0.46\%$ para las células MCF7 y de $21.97 \pm 1.14\%$ para las células MDA-MB-231, lo que claramente indica que la capacidad de formar colonias de estas últimas es significativamente superior a la de las células MCF7.

Resultados

Finalmente, se valoró el efecto del inhibidor de MNK sobre la capacidad clonogénica de las células MCF7 y MDA-MB-231. Como se observa en la **Figura 24**, las células MCF7 y MDA-MB-231 en presencia de CGP57380 forman un número significativamente menor de colonias respecto a las células que no habían sido tratadas con el inhibidor. Esto indica que la inhibición de las MNKs reduce la capacidad de estas células para formar colonias y, por lo tanto, confirman que las MNKs juegan un papel importante en la capacidad clonogénica de estas líneas de mama.

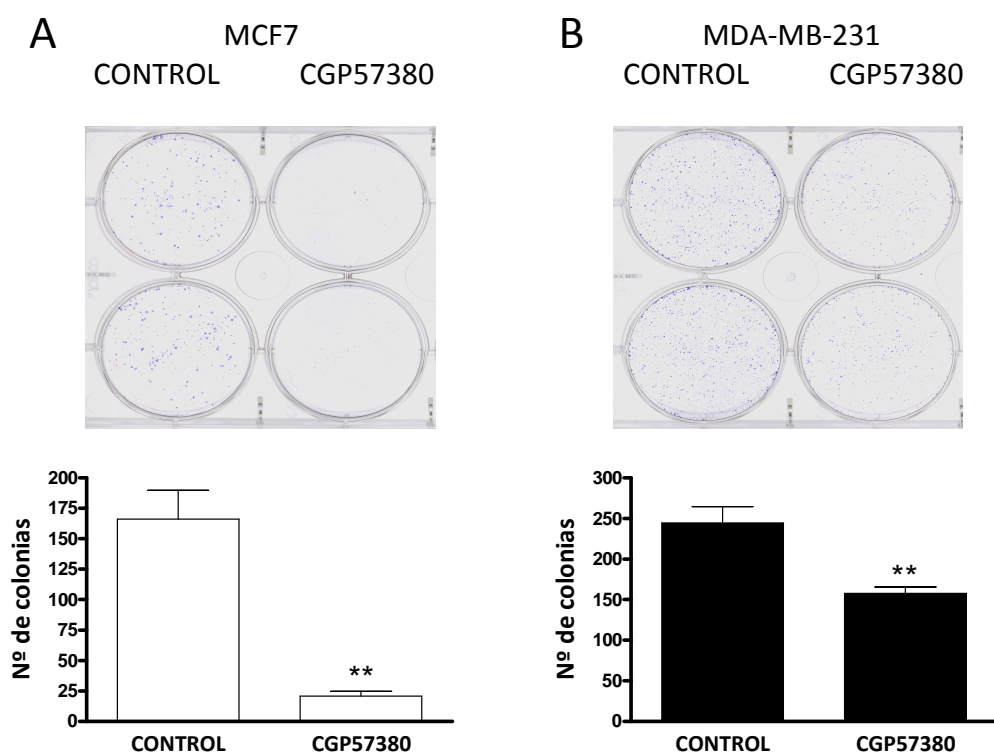


Figura 24. Efecto del CGP57380 en la formación de colonias de las células MCF7 y MDA-MB-231. Las células se sembraron en placas p24 a una densidad de 3×10^4 células/pocillo. Al cabo de 16-24 h se trataron con DMSO al 0.1% o CGP57380 a $20 \mu\text{M}$ durante 16-24 h, tras las cuales se resembraron en placas p6 a una densidad de 1×10^3 células/pocillo en presencia de DMSO o el inhibidor. Después de 8-9 días, las colonias se fijaron, tiñeron con Giemsa y contaron. Las barras representan la media \pm SEM de 3-4 experimentos independientes (** $p < 0.01$ respecto al control).

2. SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE APTÁMEROS FRENTE A MNK1b

2.1 SELECCIÓN *IN VITRO*, CLONAJE E IDENTIFICACIÓN DE APTÁMEROS FRENTE A MNK1b

Los aptámeros son obtenidos a partir de librerías de oligonucleótidos mediante ciclos consecutivos de selección (metodología SELEX). En este trabajo se utiliza una población de oligonucleótidos de DNA con una región de 40 nucleótidos de longitud con secuencia aleatoria, que teóricamente podría contener alrededor de 10^{14} - 10^{16} moléculas de secuencia diferente, lo que le confiere una elevada heterogeneidad. A medida que se van haciendo más rondas de selección esta heterogeneidad disminuye, dando lugar a una población enriquecida y homogénea de aptámeros que se unen con alta afinidad y especificidad a su proteína diana. Posteriormente, a partir de esta población enriquecida, se identifican aptámeros individuales que son caracterizados por su actividad biológica.

La selección de aptámeros de DNA específicos frente a la proteína MNK1b se realizó como se indica en el apartado 5.1 de Materiales y Métodos. Se han llevado a cabo 10 rondas sucesivas de selección y 3 contraselecciones (tras las rondas 4, 7 y 10) utilizando una resina Ni-NTA a la que se une la proteína MNK1b recombinante fusionada con una cola de 6xHIS. Para confirmar el enriquecimiento de las poblaciones obtenidas tras sucesivas rondas de selección, se realizaron ensayos de ELONA, como se describe en el apartado 5.4 de Materiales y Métodos. Como se observa en la **Figura 25**, los resultados muestran un aumento de la señal en las poblaciones obtenidas en las rondas 7 y 10, respecto a la población inicial.

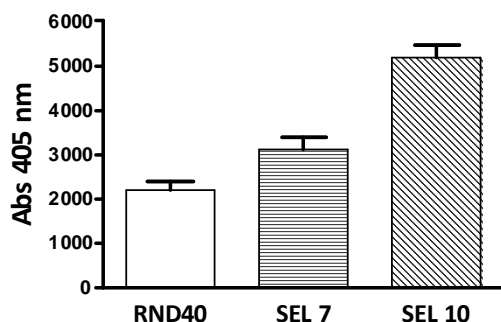


Figura 25. Estudio de la evolución de la selección mediante ELONA. La proteína His-MNK1b (5 pmol) unida a una placa se incubó con 16 pmol/pocillo (80 nM) de RND40, la población de la ronda 7 (SEL 7) o la de la ronda 10 (SEL 10) marcadas con digoxigenina. Las barras muestran la media \pm SEM de un experimento representativo.

Resultados

A la vista de este resultado, se procedió al clonaje de la población SEL 10 en un plásmido con objeto de aislar y caracterizar aptámeros individuales, como se indica en el apartado 5.2 de Materiales y Métodos. Tras el clonaje se obtuvieron 28 aptámeros cuyas secuencias fueron analizadas bioinformáticamente, lo que permitió identificar 4 secuencias o grupos de secuencias diferentes (apMKN1, apMKN2, apMKN3 y apMKN4). La secuencia correspondiente a apMKN1 se encontraba 17 veces repetida, aunque 3 de ellas presentaban mutaciones por adición de uno o más nucleótidos. La secuencia correspondiente a apMKN2 se encontró una sola vez, la de apMKN3 apareció repetida 8 veces, una de las cuales tenía una mutación de sustitución, y la secuencia de apMKN4 se encontró repetida 2 veces. Aunque la población de partida contiene moléculas de 76 nucleótidos de longitud, se observó que todas las secuencias obtenidas constan de 66 o 67 nucleótidos, excepto una de las de apMKN1, que tiene 96 nucleótidos debido a una adición, y la apMKN2, que tiene 75 nucleótidos. Esta discrepancia, quizás debida a la introducción de modificaciones durante la PCR, no fue considerada relevante ya que, independientemente de la longitud de la secuencia, resultan más importantes la estructura y la posible funcionalidad de los aptámeros.

Con el fin de estudiar la capacidad de unión de los distintos aptámeros a su diana, éstos se marcaron con digoxigenina mediante PCR y se trataron con exonucleasa para eliminar la cadena complementaria, como se describe en el apartado 5.3 de Materiales y Métodos, para su análisis mediante ELONA. Debido a que durante el proceso de selección se utilizaban las dos cadenas producidas durante la PCR, era necesario analizar ambas cadenas (denominadas como cadena F y cadena R) de cada uno de los clones. Los resultados mostraron que los aptámeros que presentan mayor capacidad de unión a la diana, alcanzando valores de al menos el doble de señal que el blanco, fueron apMKN2F, apMKN3F, apMKN3R y apMKN4F (**Figura 26A**).

Con objeto de utilizar un método alternativo para estudiar la capacidad de unión de los aptámeros a la diana, se realizaron ensayos de PCR en tiempo real (qPCR) utilizando como molde los aptámeros que se unían a complejos resina-MKN1b, como se describe en el apartado 5.5 de Materiales y Métodos. Estos ensayos también

permitían comprobar que los aptámeros seleccionados son específicos de MNK1b y no de la resina Ni-NTA. Se consideraron positivos aquellos aptámeros en los que la diferencia entre la presencia y ausencia de la proteína era de al menos 3 Cts. Como se observa en la **Figura 26B**, las Cts de los aptámeros apMNK1F, apMNK2F, apMNK4F y apMNK4R eran de 3 a 5 veces menores en presencia de MNK1b que en su ausencia.

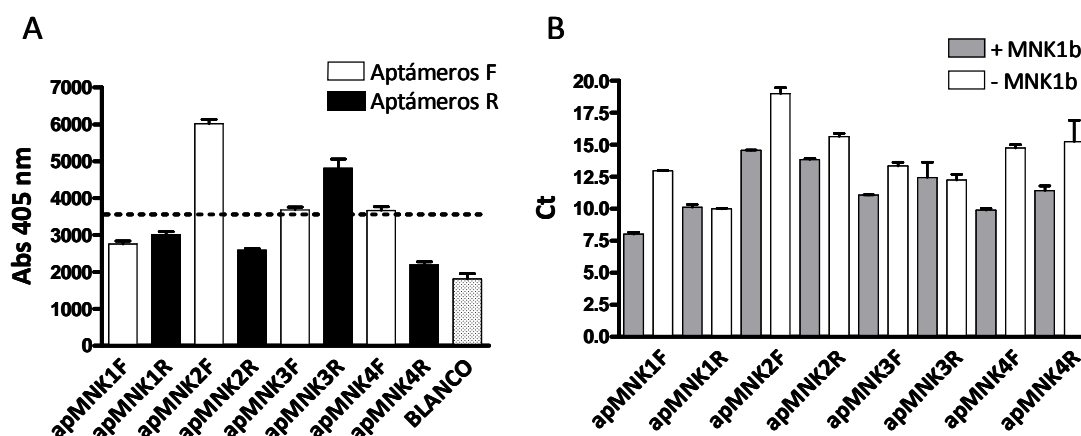


Figura 26. Análisis de la afinidad de las cadenas F y R de los aptámeros. (A) La proteína His-MNK1b (5 pmol) unida a una placa se incubó con 8 pmol/pocillo (40 nM) de los aptámeros F o R marcados con digoxigenina. Las barras muestran la media \pm SEM de un experimento representativo. La línea punteada indica el valor doble al del blanco. **(B)** Estudio de aptámeros individuales mediante formación de complejos aptámero-diana y cuantificación por qPCR como se describe en Materiales y Métodos. Se muestran los valores de Ct para cada uno de los aptámeros en presencia o ausencia de la proteína. Las barras muestran la media \pm SEM de un experimento representativo.

Considerando los resultados obtenidos en estos dos tipos de ensayos (ELONA y análisis de los complejos aptámero-diana por PCR a tiempo real), se seleccionaron aquellos aptámeros cuyo resultado era positivo en, al menos, una de las dos técnicas. Estos aptámeros son apMNK1F, apMNK2F, apMNK3F, apMNK3R, apMNK4F y apMNK4R (**Tabla 8**).

Tabla 8. Resumen de resultados obtenidos mediante ELONA y qPCR con los aptámeros.

apMNK	1F	1R	2F	2R	3F	3R	4F	4R
ELONA	-	-	+	-	+	+	+	-
qPCR	+	-	+	-	-	-	+	+

2.2 IDENTIFICACIÓN DE APTÁMEROS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA

2.2.1 Identificación de aptámeros con actividad biológica *in vitro*

Uno de los principales objetivos de seleccionar aptámeros frente a MNK1 es poder regular su actividad quinasa. Con la finalidad de poder valorar si los aptámeros afectan a la actividad de MNK1a y/o MNK1b, inhibiéndola o activándola, se realizaron ensayos de actividad quinasa *in vitro*.

En estos experimentos se analizó el efecto de los aptámeros sobre la actividad de MNK1a o MNK1b utilizando como sustrato el péptido RRLSSLRA y como quinasas MNK1a recombinante comercial o Myc-MNK1b inmunoprecipitada a partir de células que sobreexpresan la proteína. La ratio aptámero:proteína utilizada fue 2:1 para asegurarnos que había suficiente aptámero para inhibir la actividad de la quinasa y, en paralelo, se utilizó como control positivo la misma concentración (0.2 μ M) del inhibidor de MNK, CGP57380. En la **Figura 27A** se observa que sólo el aptámero apMNK3R reduce significativamente (26.5%) la actividad de MNK1a, aproximadamente la mitad que el inhibidor de MNK1 (41.6%) a la misma concentración. Sin embargo, ninguno de los aptámeros produce un efecto significativo, ni de activación ni de inhibición, respecto al control, sobre la actividad de MNK1b, en las condiciones de estos ensayos (**Figura 27B**).

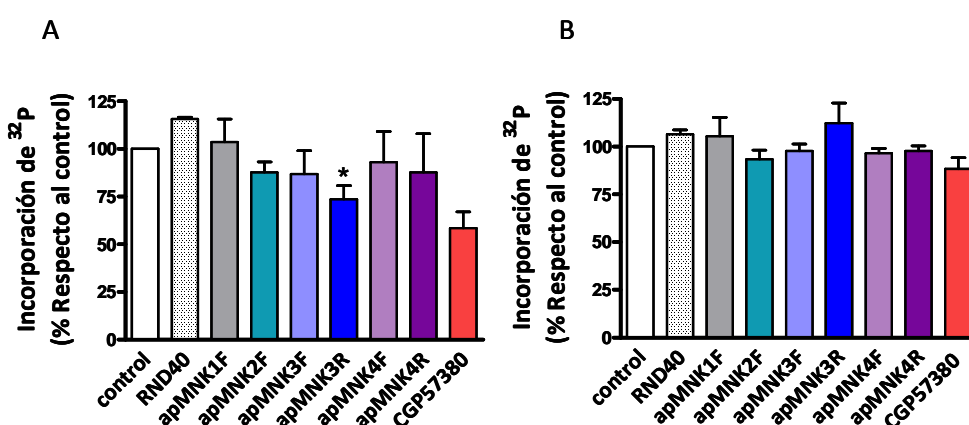


Figura 27. Efecto de los aptámeros sobre la actividad quinasa de MNK1a y MNK1b *in vitro*. Cuantificación del ensayo de la actividad quinasa *in vitro* con MNK1a recombinante y activada (**A**) y MNK1b inmunoprecipitada a partir de células que la sobreexpresan (**B**), en ausencia o presencia de 6 pmol de aptámero. Los datos se normalizaron respecto al control. Las barras representan la media \pm SEM de 2-4 experimentos independientes (* $p < 0.05$ respecto al control). Valores absolutos de control: 3008 ± 590.2 cpm (A) y 405.8 ± 150.2 cpm (B).

2.2.2 Identificación de aptámeros con actividad biológica *in vivo*

Los resultados obtenidos en los ensayos de fosforilación *in vitro*, en los que se utilizaba como sustrato un péptido sintético, parecían indicar que ninguno de los aptámeros tenía un efecto sobre la actividad quinasa de MNK1b. A la vista de este resultado, se decidió estudiar el efecto de los aptámeros *in vivo*, utilizando la línea celular HEK293T, con el fin de analizar si los niveles de fosforilación del eIF4E, sustrato de ambas isoformas de MNK1, estaban afectados por la presencia de los aptámeros.

Para ello, se sembraron células HEK293T en placas p24 y tras 16-24 h se transfectaron con los aptámeros a una concentración de 80 nM. Tras 3.5 h, las células fueron tratadas con TPA (100 nM) durante 30 min con objeto de incrementar los niveles basales del eIF4EP, que son relativamente bajos en estas células, y poder cuantificar los cambios en la fosforilación del eIF4E en presencia de los aptámeros. Los resultados muestran que, en presencia de los distintos aptámeros, los niveles del eIF4EP aumentan respecto al control, siendo los aptámeros apMNK3R y apMNK4R los únicos en los que este aumento se produce de forma significativa (**Figura 28A**). Sorprendentemente, los aptámeros estudiados no sólo no producen una disminución en la fosforilación del eIF4E sino que parece que tienden a aumentar esta fosforilación.

Los resultados mostrados en la primera parte de este trabajo indican que MNK1b presenta una elevada expresión en tejido tumoral respecto al tejido sano del mismo paciente, lo que la convierte en una potencial diana terapéutica. En este sentido, uno de los objetivos de este trabajo es identificar aptámeros específicos de MNK1b que puedan producir una inhibición de la viabilidad de las células tumorales. Así, se evaluó el efecto sobre la viabilidad celular de los distintos aptámeros, transfectados en las células HEK293T, a través de ensayos de actividad MTT, como se describe en el apartado 2.6.2 de Materiales y Métodos. En la **Figura 28B** se muestra que sólo los aptámeros apMNK2F y apMNK3R disminuyen significativamente la actividad MTT (73% y 51%, respectivamente).

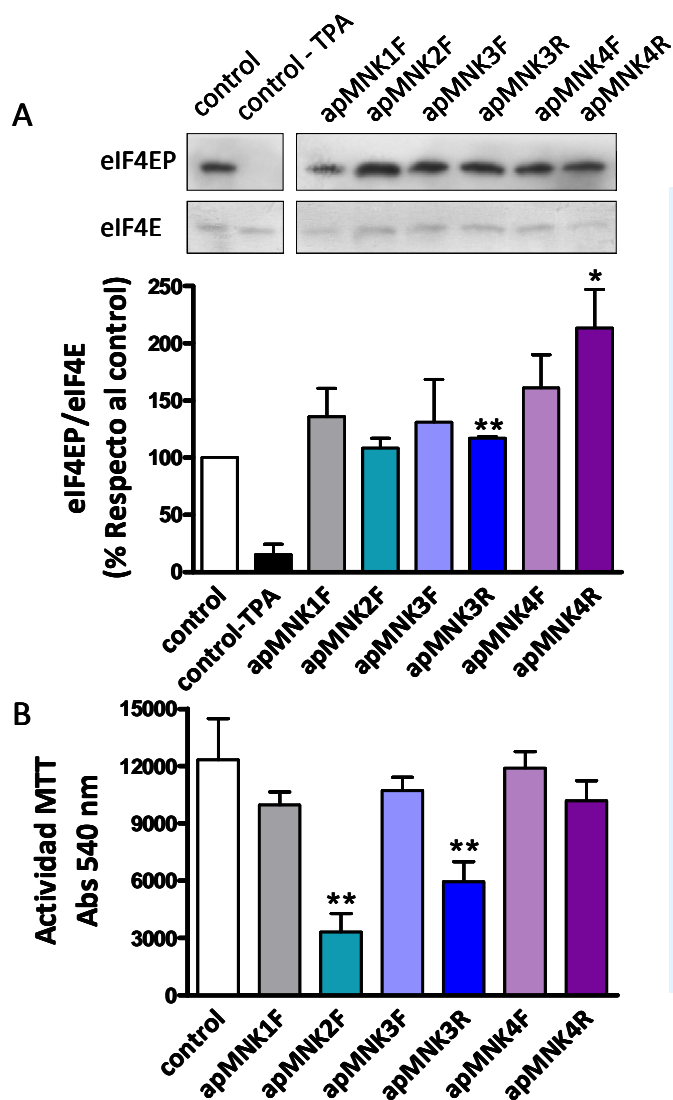


Figura 28. Efecto de los aptámeros en la fosforilación del eIF4E y en la actividad MTT en HEK293T. (A) Las células HEK293T se sembraron en placas p24 a una densidad de 1×10^5 células/pocillo. Al cabo de 16-24 h se transfectaron con 40 pmol/pocillo de aptámeros (80 nM) y se trataron con TPA durante 30 min tras 3.5 h post-transfección. Los lisados celulares se sometieron a SDS-PAGE 12% e inmunodetección y se cuantificaron los niveles del eIF4EP respecto a los del eIF4E. Las barras representan la media \pm SEM de 4 experimentos independientes. **(B)** Las células HEK293T se sembraron en placas p96 a una densidad de 2×10^4 células/pocillo. A las 16-24 h se transfectaron con 5 pmol/pocillo de aptámeros (25 nM) midiéndose la actividad MTT después de 72 h. Las barras representan la media \pm SEM de 4 experimentos independientes (** $p < 0.01$ respecto al control).

Todos estos resultados demuestran que los aptámeros apMKNK2F, apMKNK3R y apMKNK4R son los que más afectan a la actividad biológica, por lo que se decidió profundizar en su caracterización estructural y funcional.

2.3 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LOS APTÁMEROS SELECCIONADOS

2.3.1 Análisis bioinformático de las estructuras secundarias de los aptámeros

La composición nucleotídica de los aptámeros resulta relevante para su estabilidad. Así, la mayoría de los aptámeros identificados hasta el momento suelen tener una elevada cantidad de guanina y citosina. Por este motivo, se calculó la riqueza GC (%GC) de los aptámeros identificados por nosotros observándose que apMKNK2F es

el más rico en GC (66.7%), seguido de apMNK3R (60.6%) y apMNK4R (56.1%). En todos los casos, los aptámeros muestran un contenido de GC superior al 50%.

Para obtener información sobre la estructura que podrían adoptar estos aptámeros, se realizó un análisis bioinformático de sus secuencias utilizando el programa Mfold, que permite predecir las estructuras secundarias más estables en base a su energía libre (ΔG). En la **Figura 29** se muestran las estructuras secundarias más probables de los aptámeros apMNK2F, apMNK3R y apMNK4R, que son aquellas que presentan una energía libre menor.

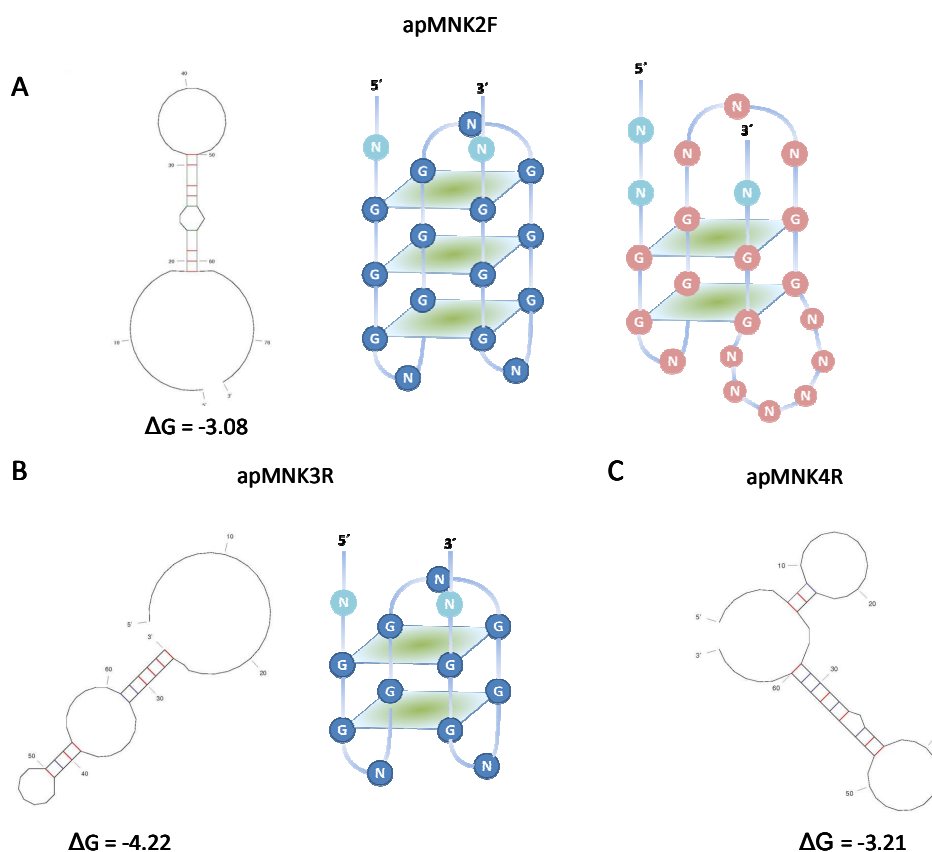


Figura 29. Estructuras secundarias y G-cuádruplex. Fueron obtenidas mediante el análisis bioinformático de las secuencias utilizando los programas Mfold y QGRS Mapper. **(A)** apMNK2F, **(B)** apMNK3R y **(C)** apMNK4R.

Muchos de los aptámeros descritos en la bibliografía hasta este momento se caracterizan por formar estructuras G-cuádruplex, que estabilizan fuertemente su

estructura terciaria. Por este motivo, y visto que las energías libres obtenidas para los aptámeros seleccionados no eran excesivamente bajas, se estudió la capacidad de dichos aptámeros de formar estructuras G-cuádruplex, utilizando el programa QGRS Mapper. Los resultados del análisis indican que el aptámero apMNK2F podría formar dos de estas estructuras, una con tres planos y otra con dos planos (**Figura 29A**), el apMNK3R una con dos planos (**Figura 29B**), mientras que apMNK4R no formaría G-cuádruplex (**Figura 29C**). Estas estructuras aportan mayor estabilidad a las moléculas por lo que parece ser que, teóricamente, apMNK2F y apMNK3R son los aptámeros más estables entre los que se han seleccionado.

2.3.2 Caracterización de la interacción de los aptámeros con MNK1 mediante ELONA

Con el fin de profundizar en el estudio de la afinidad de los aptámeros apMNK2F, apMNK3R y apMNK4R por la proteína MNK1b, se realizaron ensayos de ELONA en los que la proteína GST-MNK1b se incubó con concentraciones crecientes de aptámeros marcados con biotina. Los datos obtenidos fueron analizados usando una regresión no lineal mostrando que responden a una curva hipérbola cuya ecuación es $y = (x \times B_{max}) / (x + K_D)$, donde B_{max} es la unión máxima y K_D (constante de disociación) es la concentración de aptámero requerida para alcanzar la mitad de la unión máxima. Los aptámeros apMNK2F y apMNK3R son capaces de detectar la proteína MNK1b de forma dependiente de la concentración con K_D de 1.79 ± 0.48 nM y 6.36 ± 1.72 nM respectivamente. La K_D del aptámero apMNK4R no se calculó porque los resultados de este aptámero no mostraban diferencias significativas respecto al control negativo, para el cual sólo se utilizó la concentración de 40 nM. Como control negativo se utilizó un ssDNA de secuencia 38x(AG), que no puede adquirir ningún tipo de estructura secundaria (**Figura 30A**).

Una vez analizada la afinidad de los aptámeros por MNK1b habiendo calculado sus valores de K_D , estudiamos la capacidad de los aptámeros de reconocer de forma diferencial a MNK1a y a MNK1b. Además, con el objetivo de delimitar la región de MNK con la que interaccionan los aptámeros, se realizaron ensayos de ELONA

utilizando como dianas las proteínas MNK1a, MNK1b, MNK1a Δ 77, que tiene la secuencia de MNK1a pero el tamaño de MNK1b, y MNK1 Δ Ct, que tiene la secuencia de MNK1a pero ha perdido los 89 aminoácidos del extremo C-terminal. Como control negativo se utilizó 38x(AG). Los resultados indican que los aptámeros apMNK2F y apMNK3R son los que muestran una capacidad significativamente mayor de unirse a las distintas proteínas (**Figura 30B**). Además, aunque estos aptámeros se unen a MNK1b con mayor afinidad que al resto de las proteínas, esta diferencia es sólo significativa en el caso de MNK1 Δ Ct. Resultó interesante que el aptámero apMNK2F tiene mayor afinidad por MNK1a que el apMNK3R ($p < 0.001$).

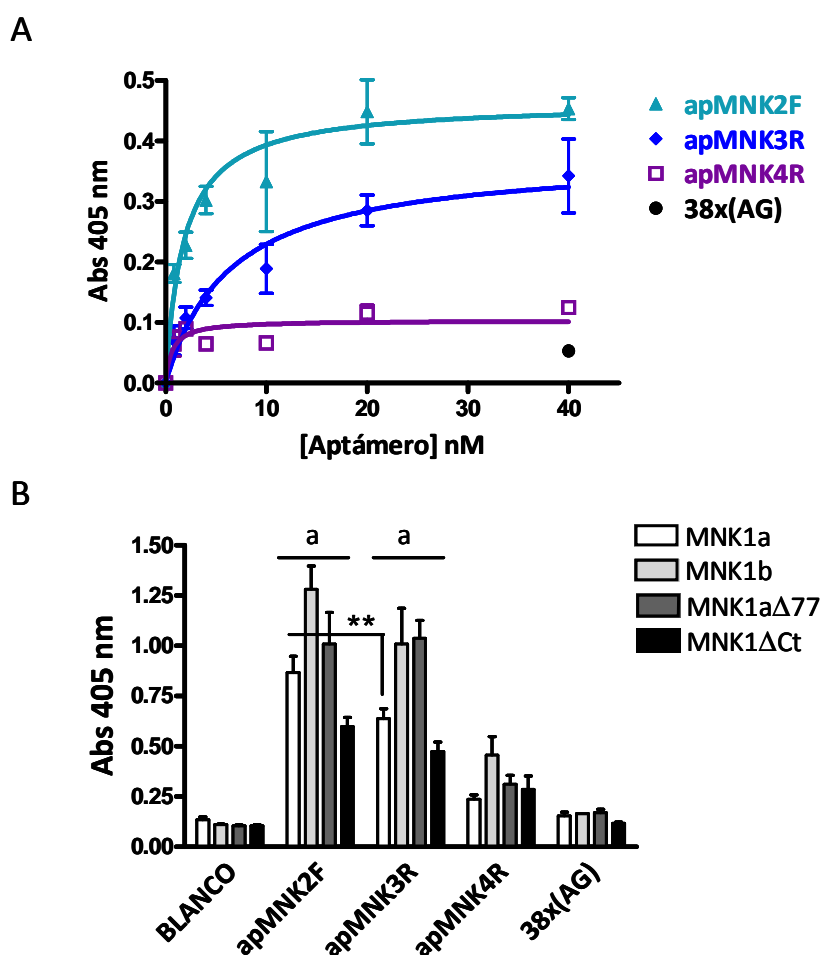


Figura 30. Caracterización de la interacción de los aptámeros con MNK1 mediante ELONA. (A) ELONAs en los que los aptámeros unidos a biotina (apMNK2F-Bio, apMNK3R-Bio, apMNK4R-Bio y 38x(AG)-Bio) a 0, 0.8, 2, 4, 10, 20 y 40 nM se incubaron con GST-MNK1b previamente dispuesta en placa a 0.2 μ g/pocillo (3 pmol/pocillo). Las barras representan la media \pm SEM de 3-6 experimentos independientes. **(B)** ELONAs en los que apMNK2F-Bio, apMNK3R-Bio, apMNK4R-Bio y 38x(AG)-Bio a 0.5 μ g/mL (20 nM) se incubaron con las GST-MNKs previamente dispuestas en placa a 0.2 μ g/pocillo (3 pmol/pocillo). Las barras representan la media \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes (** $p < 0.01$ respecto a apMNK2F y a $p < 0.001$ respecto al blanco).

2.3.3 Utilización de los aptámeros para la detección de MNK1a/b en citoquímica

Uno de los objetivos de obtener aptámeros específicos frente a la quinasa MNK1b es poderlos utilizar sustituyendo a los anticuerpos, para detectar la proteína en diferentes sistemas. Para comprobar si los aptámeros seleccionados son capaces de reconocer de manera específica MNK1a, MNK1b o ambas en técnicas de citoquímica, se utilizaron células MDA-MB-231 transfectadas de manera estable con MNK1a o MNK1b (apartado 1.2.3 de Resultados) y se utilizaron los aptámeros marcados con Alexa-488 como moléculas de reconocimiento, como se describe en el apartado 7 de Materiales y Métodos.

En primer lugar, se realizó una ICQ en células MDA-MB-231 estables control, MNK1a y MNK1b para estudiar si los anticuerpos anti-MNK1, MNK1 (C-20) y MNK1 (M-20), ya utilizados a lo largo de este trabajo, eran capaces de reconocer sus dianas MNK1a y MNK1a/b, respectivamente, en esta técnica. Como se observa en la **Figura 31**, la señal de ambos anticuerpos en las células control es muy baja y corresponde a la proteína endógena. En las células MDA-MB-231 MNK1a, el anticuerpo MNK1 (C-20) muestra una distribución citoplasmática, coincidente con lo ya descrito previamente para esta isoforma de MNK1. Por otra parte, en las células MDA-MB-231 MNK1b, la señal del anticuerpo MNK1 (M-20) aparece tanto en el citoplasma como en el núcleo, donde tiende a formar pequeños acúmulos, localización ya descrita para la isoforma MNK1b.

A continuación, se realizó el mismo tipo de ensayo utilizando los aptámeros conjugados con Alexa-488 junto con los anticuerpos, como se describe en el apartado 7 de Materiales y Métodos (**Figura 32**). Los resultados obtenidos mediante microscopía confocal utilizando la línea MDA-MB-231 MNK1a indican que tanto el aptámero apMNK2F como el apMNK3R muestran un patrón citoplasmático y, a su vez, algún acúmulo en el núcleo celular. Además, se observa colocalización entre los aptámeros y el anticuerpo MNK1 (C-20) en el citoplasma en ambos casos. Como era de esperar a la

vista de los resultados de los ensayos de ELONA (**Figura 30**), el aptámero apMNK4R presenta una señal de muy baja intensidad.

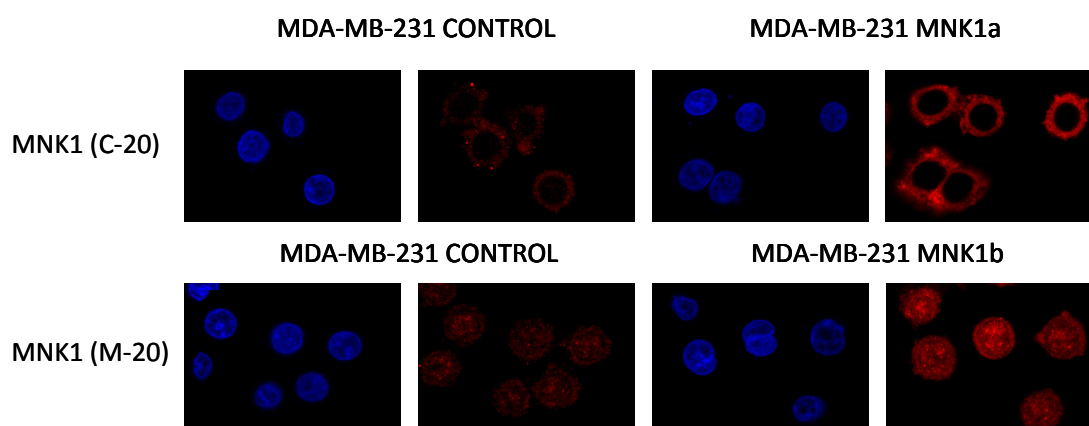


Figura 31. Inmunocitoquímica en células MDA-MB-231 estables. Los experimentos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos utilizando los anticuerpos MNK1 (C-20) y MNK1 (M-20) para evaluar la distribución de las proteínas en las células MDA-MB-231 MNK1a, y MDA-MB-231 MNK1b, respectivamente. Las muestras se analizaron por microscopía confocal. Las imágenes (60x) corresponden a la tinción de los núcleos con Hoescht (azul) y los correspondientes anticuerpos (rojo).

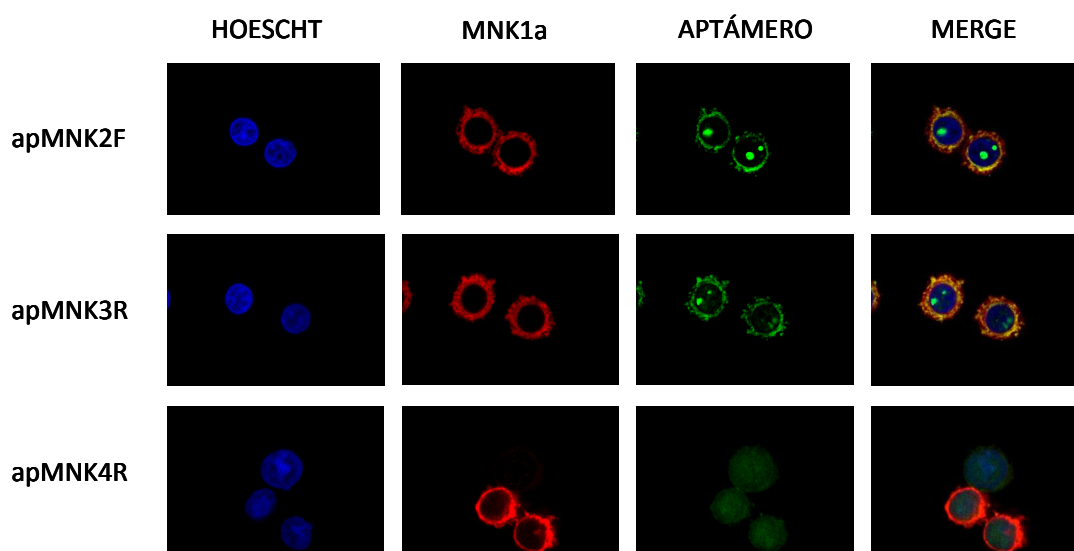


Figura 32. Aptacitoquímica en células MDA-MB-231 MNK1a. Los experimentos se realizaron utilizando los aptámeros apMNK2F, apMNK3R y apMNK4R conjugados con Alexa-488 (2 pmol/cubre) y el anticuerpo MNK1 (C-20) como se describe en Materiales y Métodos. Las muestras se analizaron por microscopía confocal. Las imágenes (60x) corresponden a la tinción de los núcleos con Hoescht (azul), los aptámeros (verde) y el anticuerpo (rojo). En la figura, también se muestra la superposición de las imágenes (merge).

Resultados

El mismo tipo de experimento se realizó con las células MDA-MB-231 MNK1b, observándose que la distribución subcelular de los aptámeros era semejante a la mostrada en la línea que sobreexpresa MNK1a. Sin embargo, en estos ensayos no se observa colocalización de los aptámeros con el anticuerpo MNK1 (M-20) en el núcleo (**Figura 33A**). Por otra parte, aunque tampoco se observa colocalización en el citoplasma, esto puede ser debido a que la intensidad del marcaje del anticuerpo es sensiblemente menor a la observada para MNK1a. Por esta razón, se decidió hacer nuevos experimentos con células transfectadas transitoriamente con el plásmido pcDNA3-Flag-MNK1b, y se analizó la colocalización del aptámero apMNK2F y el anticuerpo anti-Flag. Los resultados de estos ensayos muestran una colocalización del aptámero y del anticuerpo en el citoplasma (**Figura 33B**).

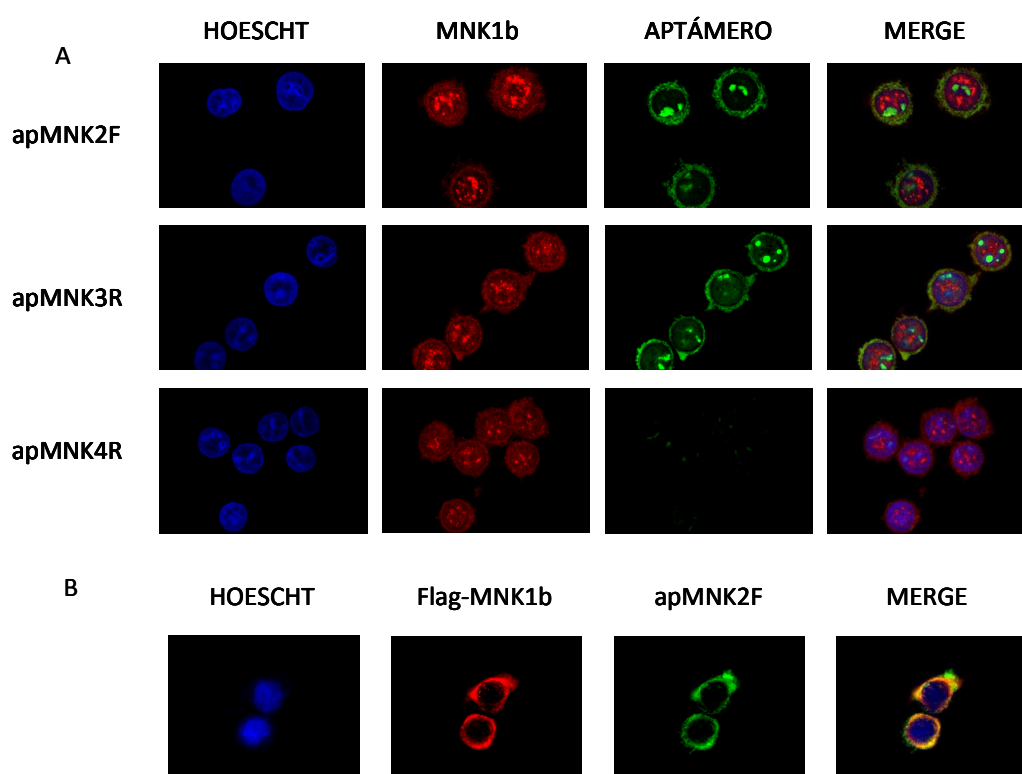


Figura 33. Aptacitoquímica en células MDA-MB-231 MNK1b (A) y en células MDA-MB-231 transfectadas con MNK1b (B). Los experimentos se realizaron utilizando los aptámeros apMNK2F, apMNK3R y apMNK4R conjugados con Alexa-488 (2 pmol/cubre) y los anticuerpos MNK1 (M-20) o anti-Flag-MNK1b, respectivamente, como se describe en Materiales y Métodos. Las muestras se analizaron por microscopía confocal. Las imágenes (60x) corresponden a la tinción de los núcleos con Hoescht (azul), los aptámeros (verde) y los anticuerpos correspondientes (rojo). En la figura, también se muestra la superposición de las imágenes (merge).

2.4 EFECTOS DE LOS APTÁMEROS SELECCIONADOS EN CÉLULAS MDA-MB-231

Para estudiar el potencial uso de los aptámeros en una línea celular tumoral, se seleccionó la línea MDA-MB-231, que es la que presenta una mayor capacidad de formar colonias y la que se transfecta de forma más eficaz de las tres líneas de mama utilizadas en este trabajo.

Uno de los aspectos más importantes a la hora de poder utilizar los aptámeros para regular la actividad de dianas intracelulares es conocer su vida media en el interior celular, que puede estar afectada tanto por su estructura como por su naturaleza molecular (DNA o RNA). Con el objetivo de estudiar la estabilidad intracelular de los aptámeros, se realizaron ensayos en los que células MDA-MB-231 fueron transfectadas con apMNK2F, apMNK3R y apMNK4R a una concentración de 125 nM. Después de 4, 24 y 72 h, se procesaron las células y se cuantificaron los niveles de aptámero intracelular, mediante qPCR, como se indica en el apartado 5.6 de Materiales y Métodos. En estos ensayos, una Ct menor indica una mayor presencia de DNA molde en la reacción y, en consecuencia, una mayor cantidad de aptámero en el interior celular. Los resultados de la qPCR muestran que, aunque hay algunas variaciones de Cts dependiendo de cada aptámero concreto y en función del tiempo transcurrido, todos los aptámeros son estables en las células al menos durante 72 h (Figura 34).

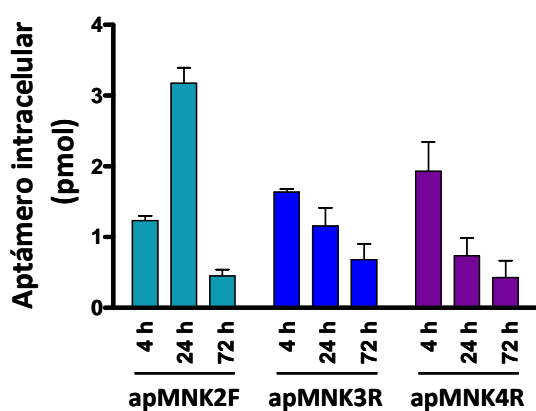


Figura 34. Estudio de la vida media de los aptámeros en las células MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se sembraron en placas p96 a una densidad de 6×10^3 células/pocillo. Al cabo de 16-24 h se transfectaron con 25 pmol/pocillo de aptámeros (125 nM) durante 4 h, 24 h y 72 h, tras lo cual se lisaron en agua obteniéndose muestras con las que se realizó una qPCR cuyos valores fueron interpolados en las rectas patrones de los aptámeros. Las barras muestran el valor medio \pm SEM de un experimento representativo.

Resultados

Para conocer cómo afectan los aptámeros a la viabilidad celular, las células se transfectaron con concentraciones crecientes de aptámeros (5, 12.5, 25 y 50 nM) y se midió la actividad MTT después de 72 h. Los resultados obtenidos muestran que los tres aptámeros frente a MNK1b disminuyen la actividad MTT de las células MDA-MB-231 de forma dependiente de la concentración, obteniéndose valores de IC₅₀ de 15 nM para apMNK2F, 20.5 nM para apMNK3R y 20 nM para apMNK4R. La IC₅₀ del aptámero lineal inespecífico 38x(AG) no pudo ser calculada porque a las concentraciones utilizadas no inhibe la actividad MTT en un 50%. Los tres aptámeros mostraron diferencias significativas respecto a sus controles y a 38x(AG) a partir de 12.5 y 25 nM respectivamente (**Figura 35**).

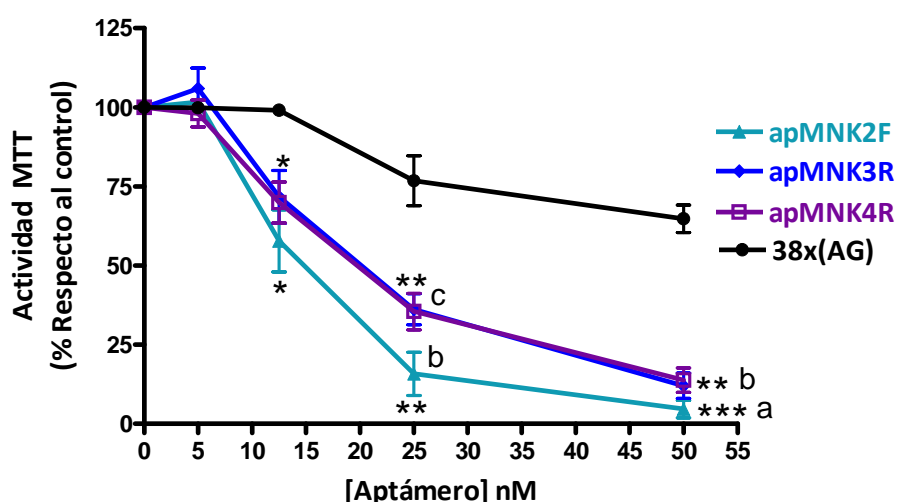


Figura 35. Efecto de los aptámeros sobre la actividad MTT de las células MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se sembraron en placas p96 a una densidad de 6×10^3 células/pocillo. Tras 16-24 h se transfectaron con aptámeros a 5, 12.5, 25 y 50 nM durante 72 h tras las cuales se realizaron ensayos de actividad MTT. La gráfica representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecto al control y c $p < 0.05$, b $p < 0.01$, a $p < 0.001$ respecto a 38x(AG))

Con el fin de analizar el efecto de los aptámeros sobre la capacidad clonogénica de las células MDA-MB-231, se realizaron ensayos de formación de colonias, como se indica en el apartado 2.7 de Materiales y Métodos. Las células se transfectaron con 10 pmol/pocillo (20 nM) de aptámeros y, tras 16-24 h, se resembraron en placas p6 a una

concentración de 10^3 células/pocillo. Tras 8-9 días, las colonias se fijaron con metanol, se tiñeron con Giemsa y se contaron. Como se puede ver en la **Figura 36A**, los aptámeros apMNK2F, apMNK3R y apMNK4R producen una disminución significativa en el número de colonias (56.9% el aptámero apMNK2F, 39.7% el apMNK3R y 47.2% el apMNK4R) respecto a las células control, mientras que el aptámero lineal inespecífico 38x(AG) no produce ningún efecto significativo. Estos resultados indican claramente que los aptámeros específicos interfieren en la capacidad clonogénica de las células MDA-MB-231 en las condiciones de este ensayo. En paralelo, se valoró el efecto de los aptámeros sobre la fosforilación del eIF4E mediante electroforesis e inmunodetección utilizando lisados procedentes de las mismas células utilizadas en los ensayos de formación de colonias. Los resultados obtenidos muestran que el aptámero apMNK2F no produce cambios en la fosforilación del eIF4E respecto al control, mientras que apMNK3R y apMNK4R inducen un aumento del eIF4EP, similar al del aptámero inespecífico, y en ningún caso estadísticamente significativo (**Figura 36B**).

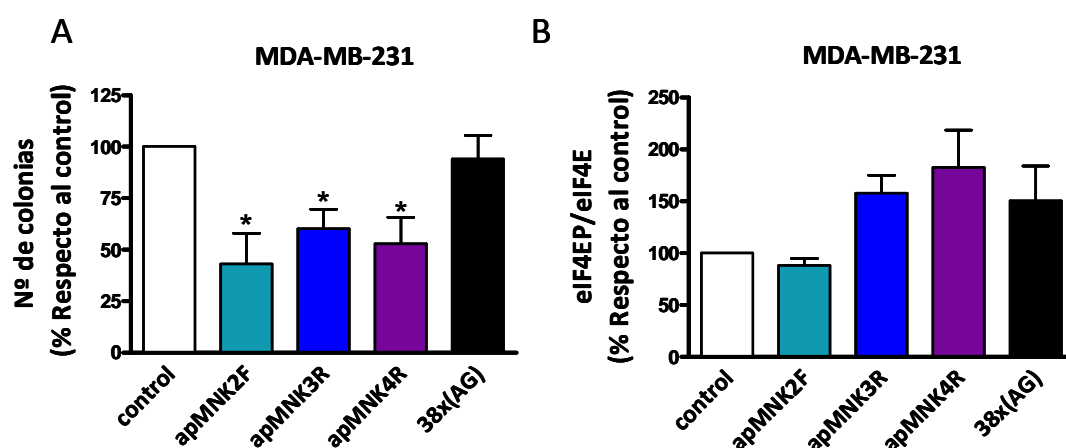


Figura 36. Efecto de los aptámeros sobre la capacidad clonogénica (A) y la fosforilación del eIF4E (B). Las células MDA-MB-231 se sembraron en placas p24 a una densidad de 3×10^4 células/pocillo y, al cabo de 16-24 h, se transfectaron con 10 pmol/pocillo de aptámeros (20 nM). Tras 16-24 h, las células se resembraron en placas p6 a una densidad de 1×10^3 células/pocillo para realizar el ensayo de formación de colonias. Después de 8-9 días, se cuantificó el número de colonias y los datos se normalizaron respecto al control. Por otra parte, las células que no fueron resembradas se lisaron, se sometieron a SDS-PAGE 12% e inmunodetección y se cuantificaron los niveles del eIF4EP respecto a los del eIF4E. Las barras representan la media \pm SEM de 2-4 experimentos independientes (* $p < 0.05$ respecto al control).

Resultados

Estos resultados, que parecen indicar que los aptámeros no producen cambios significativos en la fosforilación del eIF4E, son similares a los observados cuando se utilizó la línea HEK293T aunque en ese caso había un aumento significativo de los niveles del eIF4EP con apMNK3R y apMNK4R (**Figura 28**). Como el tiempo de transfección varía entre los dos grupos de ensayos se decidió repetir los experimentos con las células MDA-MB-231 en las condiciones utilizadas con las células HEK293T y, además, utilizar una técnica más cuantitativa, como es el ELISA. Así, las células MDA-MB-231 se sembraron en placas p96, se transfectaron con los aptámeros o se trataron con CGP57380. Se realizaron ensayos de ELISA con el kit *CytoGlowTM eIF4E (Phospho-Ser209) Colorimetric Cell-Based ELISA*, que permite cuantificar los niveles del eIF4EP y eIF4E midiendo la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro SPECTRA FLUOR (TECAN). Como se muestra en la **Figura 37**, el tratamiento con CGP57380 reduce ligeramente la fosforilación del eIF4E mientras que ninguno de los aptámeros produce un cambio significativo.

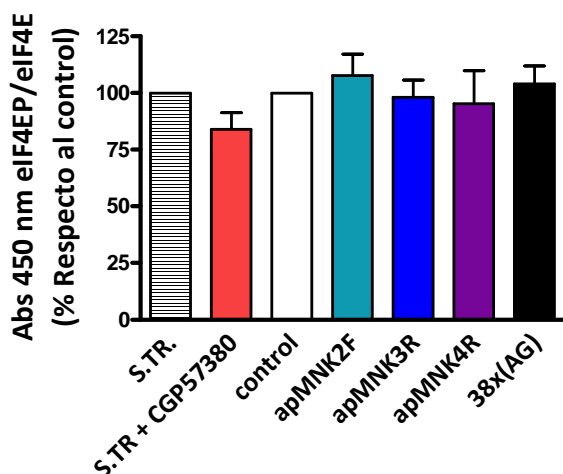


Figura 37. Efecto de los aptámeros sobre la fosforilación del eIF4E en células MDA-MB-231. Las células se sembraron en placas p96 a una densidad de 2×10^4 células/pocillo. Al cabo de 16-24 h se transfectaron con 15 pmol/pocillo de aptámeros (75 nM) o se trataron con CGP57380 a 20 μ M durante 4 h tras lo que se realizaron ensayos de ELISA. También se utilizaron células sin transfectar (S.T.R.). Se cuantificaron los niveles del eIF4EP respecto a los del eIF4E. Los datos se normalizaron respecto al control. Las barras representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes.

A la vista de estos resultados, que confirman que los aptámeros frente a MNK1 no producen cambios en la fosforilación del eIF4E, y teniendo en cuenta que la fosforilación del factor puede ser debida a la actividad tanto de MNK1 como de MNK2, decidimos utilizar siRNAs para analizar el papel de ambas quinasas en la fosforilación

del eIF4E. Los resultados obtenidos muestran que ambos siRNAs (siMNK1 y siMNK2) producen una reducción específica de los niveles de sus dianas (56.4% y 40%, respectivamente), sin afectar a la expresión de la otra quinasa (**Figura 38A y B**). Cuando se analizan los niveles de fosforilación del eIF4E en las células transfectadas con siMNK1 se observa que no cambian respecto al control, mientras que en las células transfectadas con siMNK2, estos niveles disminuyen un 66.4% (**Figura 38C**). Estos resultados indican que en las células MDA-MB-231 la fosforilación del eIF4E está mediada principalmente por MNK2 y no por MNK1, lo que explica que los aptámeros seleccionados frente a MNK1 no afecten a los niveles del eIF4EP.

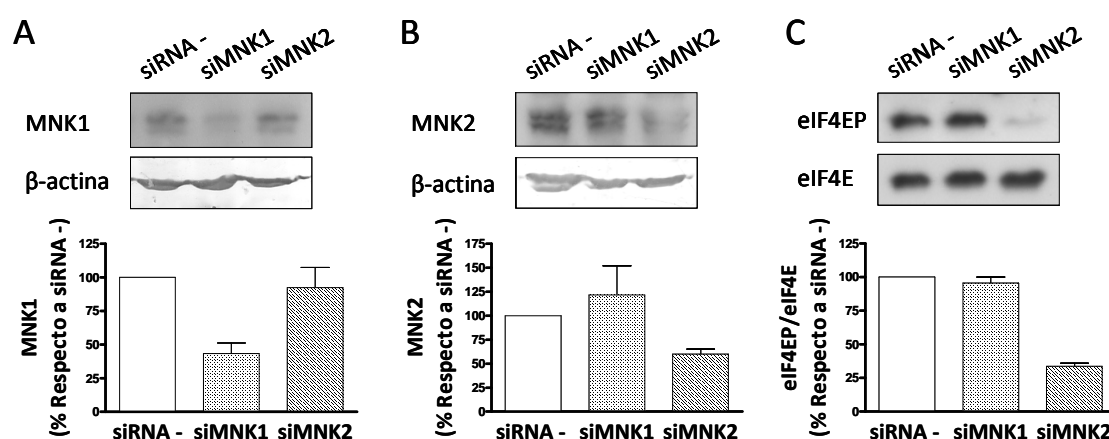


Figura 38. Efecto de la supresión de la expresión de MNK1/2 sobre la fosforilación del eIF4E. Las células MDA-MB-231 se sembraron en placas p6 a una densidad de 1.5×10^5 células/pocillo. Después de 16-24 h se transfectaron con 75 pmol/pocillo de siRNA - (control), siMNK1 y siMNK2. Tras 72 h, lisados de las células se sometieron a SDS-PAGE 12% e inmunodetección utilizando anticuerpos específicos. Los niveles de MNK1 (**A**) y MNK2 (**B**) se normalizaron respecto a los de β-actina, que se utilizó como control de carga. Cuantificación de los niveles del eIF4EP respecto a los del eIF4E (**C**). Los datos se expresan como % respecto a siRNA -. Las barras representan la media \pm SEM de 2-3 experimentos independientes.

DISCUSIÓN

El cáncer de mama es una enfermedad compleja y heterogénea respecto a la histología, origen celular, mutaciones, capacidad de metástasis, progresión de la enfermedad y respuesta terapéutica. En este trabajo se ha pretendido profundizar en el conocimiento del papel que la proteína quinasa MNK1b puede tener en el cáncer de mama, en su potencial como marcador o diana terapéutica y en los mecanismos moleculares implicados.

Se han estudiado los niveles de expresión de las quinasas MNK1a y MNK1b, así como los niveles y la fosforilación del eIF4E, tanto en muestras tumorales y controles procedentes de pacientes de cáncer de mama como en líneas celulares. Las muestras tumorales pertenecen a los subtipos moleculares LA (ER+ y/o PR+ HER2-), LB (ER+ y/o PR+ HER2-/+) , HER2 (ER- PR- HER2+) y TN (ER- PR- HER2-) mientras que las líneas celulares de mama, MCF7 (ER+ PR+ HER2-), MDA-MB-231 (ER- PR- HER2-) y BT474 (ER+ PR+ HER2+) corresponden a los subtipos LA, TN y LB, respectivamente.

En las muestras tumorales del subtipo LA se encontraron niveles de MNK1a significativamente superiores en tejido tumoral respecto al tejido sano, mientras que en los subtipos LB, HER2 y TN, los niveles de MNK1a son similares en ambos tejidos. En las células MCF7, que como todas las muestras LA estudiadas también son ER+, PR+ y HER2-, se encontró que los niveles de MNK1a son similares a los de las células BT474 y superiores a los de las células MDA-MB-231. Existe un paralelismo entre los resultados obtenidos en las muestras tumorales y en las líneas celulares, ya que tanto en los tumores LA como en las células MCF7 los niveles de MNK1a son altos. En el caso de los tumores TN no se observan cambios en los niveles de MNK1a entre tejido tumoral y sano, mientras que las células MDA-MB-231 tienen niveles bajos de esta proteína. En cambio, esta correlación no se produce entre los tumores LB y las células BT474. Este resultado se puede explicar porque el grupo de tumores LB es muy heterogéneo y tan solo una de las muestras, la nº 22, presenta el mismo perfil molecular que las células BT474 (ER+, PR+ y HER2+), y tiene unos niveles de MNK1a 2 veces superiores en tejido tumoral respecto al tejido control. Los niveles de la proteína MNK1a parecen

correlacionar con los niveles de su mRNA, con excepción de la línea MCF7. En esta línea celular, los niveles del mRNA son más bajos que los de las células BT474, mientras que los niveles de proteína son similares entre ambas líneas celulares. Este hecho puede deberse a una mayor eficiencia de la traducción en las células MCF7, probablemente debido a un metabolismo elevado, como indican los resultados obtenidos al valorar la actividad MTT (**Figura 18**).

Los altos niveles del mRNA de MNK1a en las células BT474 respecto a las otras dos líneas celulares pueden deberse, en parte, a la sobreexpresión del factor *Y-box binding protein 1* (YB-1). YB-1 es una proteína con funciones de regulación de la transcripción de genes que codifican para proteínas asociadas a progresión tumoral (Mertens y col., 1997), supervivencia celular (Wu y col., 2006), reparación y replicación de DNA (Das y col., 2007; En-Nia y col., 2005), resistencia a drogas (Stein y col., 2001) y transición epitelio-mesénquima (Evdokimova y col., 2009). Muchos estudios inmunohistoquímicos han mostrado altos niveles de la proteína YB-1 en tejido tumoral respecto al tejido sano y, además, niveles elevados de YB-1 se asocian con alto grado tumoral y peor pronóstico en cáncer de mama (Bargou y col., 1997), de pulmón (Shibahara y col., 2001), de próstata (Gimenez-Bonafe y col., 2004) y de ovario (Kamura y col., 1999). La activación de las cascadas de señalización mediadas por HER2 conlleva la fosforilación de RSK, que fosforila a YB-1 en la Ser 102 (Stratford y col., 2008), lo que hace que YB-1 se transloque al núcleo donde se une a genes diana promoviendo su transcripción. Uno de estos genes diana es el correspondiente a MNK1 (Astanehe y col., 2012), lo que concuerda con nuestros resultados, ya que las células BT474 son las que presentan los niveles más altos del mRNA de MNK1a. Otros estudios han descrito que los niveles del mRNA de YB-1 son más altos en cáncer de mama ER- (HER2 y TN) respecto a los ER+ (Lasham y col., 2011), lo que no coincide con la hipótesis de que nuestras muestras del subtipo LB y las células BT474 sobreexpresen este factor. En tumores de glioblastoma humanos se han encontrado niveles altos del mRNA de MNK1a respecto al tejido control (Grzmil y col., 2011), lo que apoya que MNK1a se sobreexpresa en cáncer, como ocurre en las muestras del subtipo LA.

Más de un 75% de las muestras HER2- (LA y TN) expresan más MNK1b en tejido tumoral que en tejido sano, mientras que en las muestras LB y HER2 los niveles de MNK1b aumentan en menos del 50% de los casos (**Figura 11C**). Estos resultados son coincidentes con los obtenidos al estudiar las líneas celulares, ya que las células MCF7 (LA) y MDA-MB-231 (TN) muestran, con variaciones entre ellas, niveles de MNK1b altos. Parece que hay una correlación inversa entre la sobreexpresión de la quinasa MNK1b y la sobreexpresión de HER2, si bien el mecanismo por el que esto se produce es desconocido. Sin embargo, aunque no supone un aumento en los niveles de MNKs, hay investigaciones que indican que el aumento de fosforilación y actividad de estas quinasas se correlaciona con la sobreexpresión de HER2 (Chrestensen y col., 2007b).

Como MNK1b se genera por procesamiento alternativo del mRNA, el hecho de que esta isoforma se encuentre sobreexpresada en algunos tipos de cáncer puede ser debido a cambios en la regulación de este mecanismo, que conlleven un aumento de niveles del mRNA de MNK1b, lo cual podría estar relacionado con la no sobreexpresión de HER2. El procesamiento alternativo afecta aproximadamente al 94% de los genes humanos (Pan y col., 2008; Wang y col., 2008a) representando la fuente principal de diversidad proteica. En cáncer, este mecanismo regulador post-transcripcional tiene un papel significativo en la producción de oncogenes y genes supresores de tumores (Bonomi y col., 2013). Los cambios en los patrones de este mecanismo tienen un papel esencial en el desarrollo, la diferenciación y la respuesta a estímulos fisiológicos de las células, pero un procesamiento alternativo aberrante genera variantes proteicas que contribuyen al establecimiento y progresión tumoral, así como a la resistencia a tratamientos terapéuticos (David y Manley, 2010). En el pre-mRNA se pueden producir mutaciones que alteren el mecanismo del procesamiento alternativo generando proteínas no funcionales o con función alterada. Además, las señales extracelulares pueden producir cambios en las vías de señalización celular que, a su vez, conlleven modificaciones en la expresión de los factores reguladores del procesamiento alternativo, alterando el patrón normal de este mecanismo. Todos estos cambios llevarían a la desregulación de procesos celulares importantes como la adhesión,

proliferación, diferenciación, muerte e invasión, que conducen a procesos cancerosos (Srebrow y Kornblihtt, 2006). Los factores reguladores del procesamiento alternativo, que reconocen secuencias diana en el pre-mRNA, son proteínas de las familias SR (*serine-arginine-rich*) y hnRNP (ribonucleoproteína heterogénea nuclear), que son activadoras y/o silenciadoras de este proceso (Ghigna y col., 2008). La proteína hnRNP A1 es sustrato de las MNKs, con lo cual estas quinasas podrían participar en su propia regulación. Las secuencias que se encuentran en los exones como elementos reguladores de procesamiento alternativo se denominan *exonic splicing enhancer* (ESE) y *exonic splicing silencer* (ESS) y las que se localizan en los intrones, *intronic splicing enhancer* (ISE) e *intronic splicing enhancer* (ISS). Se han encontrado mutaciones en elementos reguladores de procesamiento alternativo en los genes *LKB1*, *KIT*, *CDH17*, *KLF6* y *BRCA1*, y también cambios en proteínas reguladoras que afectan a la expresión de genes como *Ron*, *RAC1* y *CD44* (Srebrow y Kornblihtt, 2006). De este modo, existen variantes de proteínas generadas por procesamiento alternativo específicas de cáncer y de tipo tumoral, que podrían ser utilizadas como herramientas diagnósticas, pronósticas y terapéuticas (He y col., 2009). Por ejemplo, hay estudios que muestran que en los tumores de mama ER+, los estrógenos inhiben la expresión del factor regulador de procesamiento alternativo SRp55, promoviendo la pérdida del exón 12 del pre-mRNA de CRH-R1 (receptor de la hormona liberadora de corticotropina), lo que produce la variante CRH-R1(Δ 12) alterando la señalización mediada por CRH (Lal y col., 2013). La expresión mediante procesamiento alternativo de las distintas isoformas de CD44, glicoproteína transmembrana que participa en muchos procesos celulares, se asocia a ciertas características de los tumores de mama. Así, por ejemplo, la elevada expresión de la variante CD44v2-v10 se asocia a tumores ER+ y PR+, mientras que la alta expresión de la variante CD44v8-v10 se asocia a tumores HER2- (Olsson y col., 2011). Los mecanismos de procesamiento alternativo por los cuales se generan estas variantes están mediados por una alta expresión de la proteína SRp40, que además se relaciona con metástasis en nódulos linfoides en cáncer de mama (Huang y col., 2007). De entre los mecanismos mencionados anteriormente, el hecho de que se observe un incremento en los niveles de MNK1b en los tumores TN, que no sobreexpresan

ninguno de los receptores, respecto al tejido sano, descartaría que el procesamiento alternativo estuviese desencadenado por la unión de los ligandos a sus correspondientes receptores. Sin embargo, aún no disponemos de suficiente información que nos permita concluir si el mecanismo implicado en el procesamiento alternativo del mRNA de MNK1b es la alteración de los niveles o funcionalidad de las proteínas reguladoras y/o bien mutaciones en *cis* que puedan producirse en la secuencia de los elementos reguladores de procesamiento alternativo (ESE, ESS, ISE e ISS) dentro del propio mRNA.

Se ha demostrado que el eIF4E se encuentra sobreexpresado en una gran variedad de tipos de cáncer como mama, cuello y cabeza, colon, próstata, riñón, pulmón, etc., lo que se relaciona con la progresión de la enfermedad (Culjkovic y Borden, 2009; De Benedetti y Graff, 2004; Thumma y Kratzke, 2007). Los niveles del eIF4E se encuentran elevados en aproximadamente un 30% de los cánceres humanos, alcanzando un 50% en cáncer de mama (Borden y Culjkovic-Kraljacic, 2010). De hecho, existen numerosas investigaciones en las que se han detectado niveles elevados del eIF4E en este tipo de cáncer, aunque sin tener en cuenta el subtipo molecular (Byrnes y col., 2006; Holm y col., 2008; Li y col., 2002; McClusky y col., 2005). Algunos investigadores detectaron niveles elevados del eIF4E asociados a pacientes con tumores PR+ (Li y col., 2002). Recientemente, se ha publicado un artículo en el que se han analizado los niveles del mRNA del eIF4E en los distintos subtipos moleculares observándose un mayor incremento en el subtipo LB (Pettersson y col., 2011). De acuerdo con los estudios anteriores, en este trabajo, al analizar el eIF4E en las muestras de mama, se encontró que tanto los niveles como el grado de fosforilación de este factor aumentan significativamente en tejido tumoral respecto al tejido sano (2.4 y 1.6 veces, respectivamente). En el análisis de la expresión del factor eIF4E en función de los subtipos moleculares, los resultados obtenidos permiten concluir que los niveles del eIF4E aumentan significativamente en los subtipos LA, LB y HER2, mientras que en el caso de los TN este aumento no es estadísticamente significativo. Este dato está de acuerdo con el observado en las líneas celulares, ya que los niveles

del eIF4E son significativamente más bajos en las células MDA-MB-231 que en las otras dos líneas. Al analizar la fosforilación del eIF4E, se observó que no había cambios significativos en los tumores de los subtipos LA, LB y HER2, mientras que los niveles del eIF4EP aumentan en los tumores TN. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231. Nuevamente, la línea BT474 no correlaciona con el conjunto de los tumores LB pero sí con los resultados obtenidos para el caso nº 22, en el que la fosforilación del eIF4E aumenta más de 5 veces en tejido tumoral respecto al tejido sano. En otras investigaciones se obtuvieron resultados similares a los de este trabajo, mostrando también que las células MCF7 presentaban los niveles de fosforilación del eIF4E más bajos (Wheater y col., 2010).

Una de las hipótesis de este trabajo era que la expresión diferencial en algunos tumores de la isoforma MNK1b, que es constitutivamente activa (O'Loghlen y col., 2007; O'Loghlen y col., 2004a), sería responsable del aumento de la fosforilación del eIF4E. Sin embargo, no existe un paralelismo entre el eIF4EP y la expresión de MNK1b ni en las líneas celulares, ni en las muestras tumorales incluidas en el estudio. Los resultados indican que tampoco existe una correlación positiva entre la expresión de la isoforma MNK1a y la fosforilación del eIF4E. Se sabe que hay proteínas relacionadas con la traducción que también se localizan en el núcleo, como el eIF4G (McKendrick y col., 2001), eIF4E (Lejbkowitz y col., 1992) y 4E-BP1 (Rong y col., 2008). MNK1b es una quinasa citoplasmática y nuclear pero su papel en el núcleo es desconocido. Podría ocurrir que MNK1b fosforilase al eIF4E en el núcleo de forma independiente o dependiente del eIF4G o que fosforilase a otros sustratos, lo cual podría estar estimulado en algunos tipos de cáncer. Los resultados sugieren que las diferencias observadas en la fosforilación del eIF4E podrían ser debidas a la activación de distintas cascadas de señalización como las vías de MAPK (ERK1/2 y p38 MAPK), que activan a MNK1 por fosforilación de las treoninas del bucle de activación, y la vía PI3K/AKT/mTOR, que inhibe a 4E-BP1 y aumenta la cantidad del eIF4E disponible para ser fosforilado. Efectivamente, nuestros resultados muestran claras diferencias en la

activación de estas dos vías en las diferentes líneas celulares, que podrían explicarse por sus características moleculares específicas.

Se ha descrito que las células MCF7 tienen la proteína PTEN funcional, mutaciones en la isoforma de PI3K con subunidad catalítica α (PIK3CA) y sobreexpresión de AKT1 (Hollestelle y col., 2010). Las mutaciones en el gen *PIK3CA* son comunes en cáncer de mama (Bachman y col., 2004) y suelen conllevar activación constitutiva de AKT, S6K y 4E-BP1 en modelos celulares (Kang y col., 2005). A pesar de esto y de la sobreexpresión de AKT1, nuestros resultados indican que estas células tienen poco activada la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR, con lo que se produciría una menor fosforilación de 4E-BP1 que llevaría a que esta proteína se uniera más al eIF4E. De hecho, estas células presentan niveles altos del complejo 4E-BP1/eIF4E y tienen niveles bajos de fosforilación del eIF4E a pesar de tener activa la vía de MAPK (**Figura 39A**).

Las células MDA-MB-231 tienen la proteína PTEN funcional, mutaciones en las proteínas B-Raf y K-Ras (Hollestelle y col., 2010). Además, presentan activación constitutiva de ERK (Fukazawa y col., 2002; Hoshino y col., 1999) y alta expresión de p38 α respecto a otras líneas (Chrestensen y col., 2007b), lo que coincide con los resultados de este trabajo. Asimismo, estas células tienen activas las vías de señalización celular PI3K/AKT/mTOR y la de las MAPK, por lo que tendrían alta fosforilación de 4E-BP1 de modo que éste no se uniría al eIF4E que estaría disponible para formar parte de los complejos eIF4F (**Figura 39B**). En los ensayos de afinidad del eIF4G y 4E-BP1 por el eIF4E realizados en este trabajo, no pudimos estudiar la proporción del eIF4E unida a eIF4G al no disponer de buenos anticuerpos. En otros estudios se observa que las células MCF7 tienen niveles bajos de eIF4G/eIF4E, en comparación con otras líneas como las células MDA-MB-231, en las que se detectan niveles altos de este complejo y, además, tienen la proteína 4E-BP1 fosforilada de forma constitutiva (Avdulov y col., 2004). De acuerdo con estos resultados, aunque nosotros no hemos encontrado diferencias significativas en el complejo 4E-BP1/eIF4E

Discusión

entre las células MCF7 y MDA-MB-231, es probable que los niveles de eIF4G/eIF4E sean superiores en las MDA-MB-231, por lo que dispondrían de más eIF4E libre para unirse a eIF4G y ser fosforilado por MNK1/2.

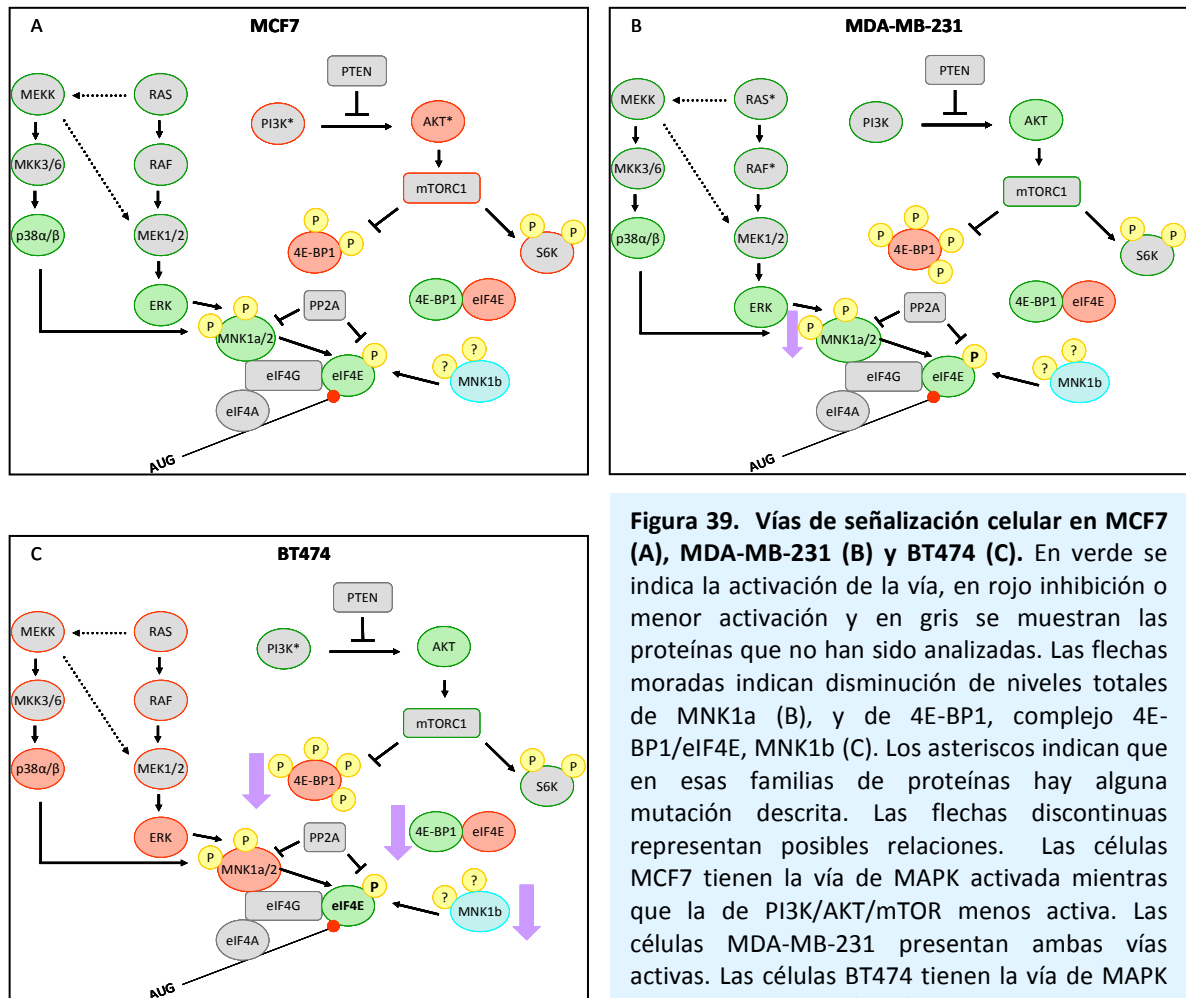


Figura 39. Vías de señalización celular en MCF7 (A), MDA-MB-231 (B) y BT474 (C). En verde se indica la activación de la vía, en rojo inhibición o menor activación y en gris se muestran las proteínas que no han sido analizadas. Las flechas moradas indican disminución de niveles totales de MNK1a (B), y de 4E-BP1, complejo 4E-BP1/eIF4E, MNK1b (C). Los asteriscos indican que en esas familias de proteínas hay alguna mutación descrita. Las flechas discontinuas representan posibles relaciones. Las células MCF7 tienen la vía de MAPK activada mientras que la de PI3K/AKT/mTOR menos activa. Las células MDA-MB-231 presentan ambas vías activas. Las células BT474 tienen la vía de MAPK inhibida y la de PI3K/AKT/mTOR activada.

La línea BT474 tiene la proteína PTEN funcional y mutaciones en la PIK3CA (Hollestelle y col., 2010). Hay estudios que indican que las células BT474 tienen niveles de fosforilación de AKT altos y superiores a los de las células MCF7 y MDA-MB-231 (Dey y col., 2013; Sangai y col., 2012), lo que también ha sido corroborado en este trabajo. Además, otros investigadores han observado que los tumores de mama HER2+ tienen niveles más altos de fosforilación de AKT que los HER2- (Rojo y col., 2007) lo

que coincide con que las células BT474 son HER2+ respecto a las MCF7 y MDA-MB-231 que son HER2-. Las células BT474 tienen niveles de 4E-BP1 significativamente menores a los de las otras líneas y además, tienen más activa la vía PI3K/AKT/mTOR con lo que se produciría una mayor fosforilación de 4E-BP1 que impediría que ésta se uniera al eIF4E (**Figura 39C**). En estas células, la menor formación del complejo 4E-BP1/eIF4E sugiere que hay una mayor cantidad del eIF4E disponible para formar parte del complejo eIF4F y, en consecuencia, poder ser fosforilado por las quinasas. Este resultado explica los mayores niveles de fosforilación del eIF4E observados en esta línea.

El estudio de las vías de señalización en las líneas celulares de cáncer de mama demuestra que la inhibición o no activación de la vía de las MAPK no impide la presencia de niveles altos del eIF4EP, como se observa en las células BT474. Esto indica que la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR/4E-BP1, que regula la disponibilidad del eIF4E para la formación de los complejos eIF4F, es muy importante para la fosforilación del eIF4E. De hecho, en las células MCF7, que tienen menores niveles del eIF4EP respecto a las otras líneas celulares, esta vía de señalización está poco activa. Además de que la cascada de señalización PI3K/AKT/mTOR/4E-BP1 tenga un papel relevante en la fosforilación del eIF4E, también sería posible la participación de la fosforilación de MNK1b, ya que las células BT474 presentan altos niveles de fosforilación del eIF4E a pesar de los niveles bajos de MNK1b y la menor actividad de la vía de las MAPK. Puesto que no hemos podido determinar los niveles de fosforilación de MNK1b en las distintas líneas celulares, no sabemos si esta quinasa podría estar participando muy activamente en la fosforilación del eIF4E, ya sea por su actividad constitutiva, mediante la fosforilación de otros sustratos, porque la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR/4E-BP1 la regule de algún modo o por algún mecanismo aún desconocido como la dimerización o la activación por otras quinasas.

En cáncer de mama las mutaciones en la proteína PTEN son poco frecuentes, pero la pérdida de esta proteína, ya sea a causa de metilación de promotores,

eliminación de heterocigosidad o por cambios en la regulación a nivel de RNA o proteína, es más común (Stemke-Hale y col., 2008). Las células MCF7, MDA-MB-231 y BT474 tienen PTEN funcional y en niveles detectables por inmunodetección observándose que las células MCF7 presentan niveles de PTEN superiores a los de las células MDA-MB-231 (Kharmate y col., 2013; Sangai y col., 2012). Esto justifica que las células MCF7 tengan la vía PI3K/AKT/mTOR inhibida o poco activa a pesar de la sobreexpresión de AKT1 y la probable activación constitutiva de PI3K debido a la mutación en *PIK3CA*.

Una proteína que también puede estar participando en la regulación de las vías de señalización celular es la PP2A, que es una Ser-Thr fosfatasa que inhibe las vías PI3K/AKT/mTOR y la de las MAPK. De este modo, cambios en PP2A pueden contribuir directamente al desarrollo del cáncer, aumento de crecimiento celular y disminución de apoptosis (Chen y col., 2004; Wang y col., 2004). PP2A regula negativamente la fosforilación del eIF4E y el ensamblaje del complejo eIF4F mediante la desfosforilación directa de las MNKs y del eIF4E, llevando a la reducción parcial de ciertas proteínas oncogénicas como c-Myc (Li y col., 2010). PP2A se encuentra muy expresada en MCF7 y MDA-MB-231 (Keen y col., 2005). Hay estudios que indican que la actividad de PP2A es mayor en líneas celulares ER+, como las células MCF7, que en líneas celulares ER-, como la línea MDA-MB-231 (Gopalakrishna y col., 1999), lo que estaría de acuerdo con los menores niveles del eIF4EP en las células MCF7 respecto a los de las células MDA-MB-231, pero no estaría de acuerdo con las células BT474, que son las que presentan mayores niveles del eIF4EP y son ER+. Aunque según esto, las células BT474 tuvieran niveles altos de PP2A, ésta podría tener modificaciones que la inactivaran, por lo que aumentaría la fosforilación del eIF4E. De hecho, se ha descrito que cuando la PP2A se fosforila en el residuo Tyr 307 se inactiva, perdiendo su actividad fosfatasa (Chen y col., 1992; Longin y col., 2007) y que en tumores que sobreexpresan HER2 hay una alta fosforilación de este residuo lo que se relaciona significativamente con la progresión del cáncer de mama (Wong y col., 2009).

Por otra parte, no se puede descartar la implicación de MNK2 en la fosforilación del eIF4E. MNK1 y MNK2 están estrechamente relacionadas pero tienen diferencias en sus actividades basales y regulación. Así, MNK2 tiene una actividad basal más alta que MNK1, es menos sensible a las vías de señalización de ERK y p38, y se une con menor afinidad al eIF4G (Parra y col., 2005). No se sabe por qué existen dos quinasas que fosforilan al eIF4E pero que muestran actividades basales distintas. Se ha sugerido que los cambios en la fosforilación del eIF4E en respuesta a estímulos de crecimiento o estrés pueden estar regulados por MNK1, mientras que MNK2 sería responsable del mantenimiento de los niveles basales del eIF4EP, permitiendo la síntesis de proteínas esenciales para la supervivencia celular (Scheper y col., 2001). Es posible que en células tumorales la actividad de MNK2 sea mayoritaria para asegurar una mayor supervivencia celular y, por ello, no encontremos una correlación clara entre los niveles de las dos isoformas de MNK1 y los del eIF4EP.

La línea celular MDA-MB-231 presenta mayor proliferación celular y actividad clonogénica que las líneas MCF7 y BT474, lo que coincide con datos de tumores pertenecientes al subtipo molecular TN que se caracterizan por tener altas tasas de proliferación y metástasis, así como peor pronóstico comparado con otros subtipos (Ossovskaia y col., 2011). Los inhibidores de MNK1 o de las cascadas de las MAPK que la activan tienen un efecto diferente sobre las tres líneas celulares. Así, el inhibidor de la p38, el SB203580, disminuye la actividad MTT de las células MCF7 y BT474, pero no afecta a las células MDA-MB-231. La disminución de la actividad MTT parece no estar mediada por la disminución de los niveles del eIF4EP, ya que éstos no disminuyen en presencia de SB203580 en ninguna de las tres líneas celulares. Este resultado, que parece sorprendente, podría explicarse porque el SB203580 puede promover un aumento de la interacción de MNK1 y eIF4G, como muestran otros trabajos (Morley y Naegele, 2003), lo que favorecería la fosforilación del eIF4E. Además, dado que p38 tiene un amplio espectro de sustratos (Cargnello y Roux, 2011), el efecto del SB203580 sobre la actividad MTT no tendría por qué estar mediado por la fosforilación del eIF4E.

El U0126 (que inhibe a MEK, por lo que anula la activación de ERK1/2) produce una disminución significativa de la actividad MTT y reduce los niveles del eIF4EP en las tres líneas celulares. La disminución de la actividad MTT es mayor con U0126 que con el resto de inhibidores estudiados, probablemente debido a que la cascada de señalización de ERK es muy amplia y podrían verse afectados otros muchos sustratos (Yoon y Seger, 2006). Otros investigadores han demostrado que el U0126 inhibe el crecimiento de las células MDA-MB-231, que tienen activación constitutiva de ERK (Fukazawa y col., 2002) y, además, reduce la capacidad de formación de colonias en células MEF (fibroblastos embrionarios de ratón), que sobreexpresan HER2/3 (Benlimame y col., 2005).

El CGP57380, inhibidor específico de las MNKs, produce una disminución en los niveles del eIF4EP en las tres líneas celulares y en la actividad MTT de las células MCF7 y MDA-MB-231, mientras que no afecta a las células BT474. La resistencia de las células BT474 podría deberse a que tienen altos niveles del eIF4EP, lo que amortiguaría la acción del inhibidor, pero esta hipótesis necesita ser corroborada. Las células MDA-MB-231 son las más sensibles al inhibidor CGP57380 en cuanto a actividad MTT. Sin embargo, estos resultados no coinciden con los de otro trabajo en el cual, al utilizar CGP57380 en las mismas condiciones, se producía una inhibición moderada (20-30%) de la actividad MTT en las células BT474 y MDA-MB-231 y resistencia en las células MCF7 (Wheater y col., 2010). Esta discrepancia podría deberse a la diferente sensibilidad de las células en función de las condiciones del cultivo y del número de pases al que se les haya sometido. Un hecho que puede explicar que las células MDA-MB-231 sean las más sensibles al CGP57380 es que presentan los niveles más bajos de MNK1a. Para comprobar esta hipótesis, se estudió si la sobreexpresión de MNK1a y MNK1b, de forma transitoria y estable, en células MDA-MB-231 tratadas con CGP57380 producía una reversión del efecto. Aunque los resultados obtenidos no son concluyentes, sí se observa un pequeño efecto del inhibidor, lo que sugiere que la sobreexpresión de las MNKs podría disminuir la sensibilidad al CGP57380 de estas células (**Figura 23**).

El inhibidor de MNK CGP57380 inhibe de manera significativa la capacidad de formación de colonias en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231, lo que indica que las MNKs juegan un papel importante en la capacidad clonogénica de estas células. Esto podría explicarse porque al inhibir las MNKs, disminuyen los niveles del eIF4E lo que regula la traducción específica de genes implicados en la proliferación celular. Existen resultados previos que demuestran que el CGP57380 disminuye el número de colonias en diferentes líneas de mama (Chrestensen y col., 2007b). Sorprendentemente, en este trabajo, y al contrario de lo que ocurre en nuestros ensayos, las células MCF7 son resistentes al inhibidor. Por otra parte, existen diferentes trabajos que demuestran que la sobreexpresión de eIF4Es mutados, incapaces de fosforilarse (Topisirovic y col., 2004), la transfección con siRNAs para eIF4E (Soni y col., 2008), y el tratamiento con el inhibidor del eIF4E, ribavirina (Pettersson y col., 2011), también disminuyen el número de colonias en diferentes líneas celulares.

La obtención de inhibidores de las quinasas MNKs que permitan bloquear su actividad reduciendo la fosforilación del eIF4E, la proliferación y la supervivencia celular, podría permitir el tratamiento de distintos procesos tumorales en los que estas proteínas estuviesen implicadas. Existen inhibidores de estas quinasas como el CGP57380, utilizado en este trabajo, y la cercosporamida, entre otros. Aunque el CGP57380 es un inhibidor de MNK (Knauf y col., 2001), hay estudios que han demostrado que este compuesto también inhibe otras quinasas tan potentemente como a MNK, por lo que no puede considerarse un inhibidor específico (Bain y col., 2007). La cercosporamida es un inhibidor de las MNKs, y particularmente de MNK2, pero también tiene efecto inhibitorio sobre otras quinasas, aunque con menor potencia (Konicek y col., 2011). Además, se ha comprobado que un tratamiento prolongado con inhibidores de mTOR, como la rapamicina, en células tumorales, produce alta actividad de PI3K promoviendo supervivencia celular (Wang y col., 2007). Como los inhibidores de las quinasas MNKs ya existentes no son del todo específicos y resulta complicado conseguir siRNAs frente a MNK1b (O'Loughlen y col., 2004b), en este

trabajo nos propusimos seleccionar y caracterizar aptámeros que pudieran ser inhibidores de MNK1b, contribuyendo al tratamiento del cáncer y a determinar de forma específica el papel de MNK1b en la tumorigénesis. Por otra parte, estos aptámeros podrían utilizarse en el diseño de sistemas diagnósticos que permitiesen identificar MNK1b en tejidos tumorales.

A pesar de que el proceso de selección de aptámeros se realizó frente a MNK1b y que se esperaban obtener aptámeros específicos frente a dicha quinasa, se sabía que era muy probable obtener aptámeros que también reconocieran a MNK1a, debido a las grandes similitudes entre ambas isoformas de la proteína. Aún así, no se llevaron a cabo estrategias para evitar esto porque se consideró interesante la obtención de aptámeros frente a ambas quinasas.

Como se indica en la sección de Resultados, los aptámeros obtenidos a partir de la ronda 10 de selección, mostraban mayoritariamente un tamaño de 66-67 nucleótidos, más corto que el de la población de partida. Puesto que este resultado era muy sorprendente, se decidió analizar por secuenciación masiva la ronda 7 (datos no mostrados) observándose que, ya en esta ronda, la mayoría de los aptámeros tenían 66-67 nucleótidos y los aptámeros más frecuentes eran los mismos que los obtenidos en la ronda 10. La heterogeneidad de las secuencias obtenidas en estas rondas fue muy baja y una de las secuencias, la apMNK1, se encontró muy representada respecto al resto.

Por otro lado, con el método de selección utilizado en este trabajo, no era posible discernir cuál de las dos cadenas era la específica, por lo que para cada secuencia se analizaron las dos cadenas en distintos tipos de ensayos. Una vez analizados los resultados obtenidos en los ensayos de ELONA, qPCR, actividad biológica *in vitro* e *in vivo*, y actividad MTT, se identificaron los aptámeros apMNK2F, apMNK3R y apMNK4R como los más prometedores.

El análisis de las secuencias de estos aptámeros reveló que todos ellos mostraban una riqueza en GC superior al 50%, lo cual sugiere una elevada estabilidad estructural. Por otra parte, el estudio bioinformático de las secuencias proporcionó los valores de energía libre y las estructuras secundarias más estables, así como la posibilidad de los distintos aptámeros de formar estructuras G-cuádruplex. En nuestro laboratorio, hemos observado que los aptámeros que presentan valores de energía libre más altos y, en consecuencia, serían termodinámicamente más inestables, son los que suelen presentar estructuras G-cuádruplex, lo que les permitiría incrementar su estabilidad. Esto ocurre para los aptámeros seleccionados, ya que apMNK2F y apMNK3R, que presentan energía libres relativamente altas, son los que tienen la posibilidad de formar G-cuádruplex. Es razonable pensar que los aptámeros deben tener una elevada estabilidad, lo que es importante para su posterior aplicación en sistemas biológicos, ya que es necesario que entren en las células y alcancen sus proteínas dianas sin ser degradados.

Otro aspecto importante de los aptámeros, además de su estabilidad, es su tamaño. Es de esperar que si el aptámero es más pequeño, le será más fácil entrar en las células y unirse a su diana. Con objeto de reducir el tamaño del aptámero apMNK2F, se realizó un análisis de su estructura secundaria, observándose que existen regiones de la secuencia que no formaban parte de la estructura del aptámero. En consecuencia, dichas secuencias se eliminaron diseñándose un aptámero apMNK2F truncado, que constaba de 48 nucleótidos en lugar de los 75 del aptámero original. El análisis mediante ELONA indicó que este aptámero apMNK2F truncado reconocía a MNK1b igual que el aptámero apMNK2F (datos no mostrados) aunque sería necesario realizar otros tipos de ensayos para comparar ambos aptámeros y analizar su posterior aplicación. El hecho de reducir el tamaño del aptámero sin alterar su estabilidad podría ser una ventaja para su utilización en organismos vivos ya que la entrada en las células y sus compartimentos sería más eficiente.

Los estudios dirigidos a determinar la especificidad de los aptámeros muestran que todos reconocen ambas isoformas de la proteína, aunque se unen con mayor afinidad a MNK1b. Resulta interesante el hecho de que los aptámeros reconocen el mutante MNK1a Δ 77, que tiene el mismo tamaño que MNK1b pero su secuencia corresponde a la de MNK1a, de forma similar a MNK1b, mientras que el mutante MNK1 Δ Ct, que carece de los 89 aminoácidos del extremo C-terminal, presenta un reconocimiento significativamente menor. Esto podría indicar que la secuencia a la que se unen los aptámeros estaría localizada en la región comprendida entre los aminoácidos comunes a ambas isoformas y la región específica de MNK1b, MNK1bSR (Figura 40).

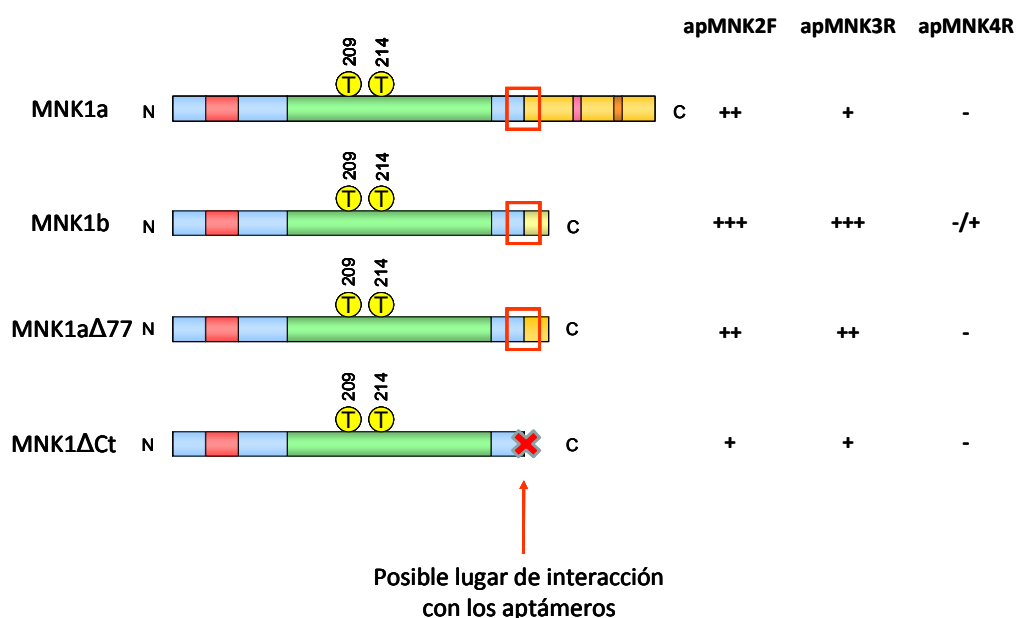


Figura 40. Esquema de MNK1a, MNK1b, MNK1a Δ 77 y MNK1 Δ Ct y el posible lugar de interacción con los aptámeros. Se muestra también el grado de unión de los distintos aptámeros a las distintas quinasas.

Aunque todos los aptámeros son capaces de reconocer y/o unirse a MNK1, no hemos sido capaces de determinar un efecto claro de los mismos sobre la actividad quinasa de la proteína. Los resultados muestran que sólo apMNK3R produce una inhibición significativa de la actividad quinasa *in vitro*. Sin embargo, en los ensayos en los que se valora la fosforilación del eIF4E en células transfectadas con aptámeros, no

se detecta disminución de esta fosforilación, observándose incluso un aumento en el caso de los aptámeros apMNK3R y apMNK4R. Estos resultados son contradictorios ya que, aunque parece que el aptámero apMNK3R tiene algún efecto inhibitorio sobre un péptido fosforilable por distintas quinasas, no parece inhibir la fosforilación del eIF4E en las condiciones utilizadas en nuestros ensayos. Por tanto, no se puede descartar que apMNK3R pueda tener algún efecto en la fosforilación de sustratos distintos al eIF4E.

Los aptámeros apMNK2F, apMNK3R y apMNK4R disminuyen la actividad MTT en las células MDA-MB-231 de forma dependiente de la concentración, con valores de IC₅₀ de 15 nM para apMNK2F, 20.5 nM para apMNK3R y 20 nM para apMNK4R, con lo que tienen un efecto antiproliferativo. Recientemente, se ha descrito que las retinamidas, un tipo de agentes bloqueantes del metabolismo del ácido retinoico, son capaces de degradar a MNK1, bloquear la fosforilación del eIF4E, inhibir la proliferación celular, disminuir la formación de colonias, inducir apoptosis e impedir la invasión tumoral en células de cáncer de mama pertenecientes a los subtipos moleculares TN (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) y HER2 (SKBR3). Los ensayos de actividad MTT realizados en esas líneas celulares con distintas retinamidas mostraron valores de IC₅₀ en el rango μ M, la línea MDA-MB-231 tratada con CGP57380 presentó un valor de 36.3 μ M y con cercosporamida, de 43.65 μ M (Ramalingam y col., 2014) mientras que en nuestro trabajo los aptámeros apMNK2F, apMNK3R y apMNK4R presentan valores de IC₅₀ de un orden de magnitud inferior (nM).

No sabemos con exactitud el mecanismo biológico que está mediando la disminución de la viabilidad celular y del número de colonias producida por los aptámeros apMNK2F, apMNK3R y apMNK4R en las células MDA-MB-231. Los resultados obtenidos muestran que los distintos aptámeros no afectan a los niveles de fosforilación del eIF4E. Este resultado podría explicarse debido a que, como demostramos en los ensayos realizados utilizando siRNAs (**Figura 38**), la fosforilación del eIF4E en las células MDA-MB-231 está mediada principalmente por MNK2 y no por

MNK1. Sería interesante realizar este estudio en las otras líneas celulares de mama y comprobar que los aptámeros estudiados no reconocen a MNK2. Sin embargo, no podemos descartar que el efecto de los aptámeros sea específico de MNK1 regulando la fosforilación de otros sustratos de las MNKs, como hnRNP A1, PSF y Sprouty 2, que también están implicados en tumorigénesis. Hay estudios que indican que hnRNP A1 está sobreexpresada en líneas celulares de carcinoma hepatocelular y promueve invasión tumoral (Zhou y col., 2013) y que la expresión de hnRNP A1 está alterada en cáncer renal afectando al procesamiento alternativo de genes relacionados con el crecimiento tumoral (Piekielko-Witkowska y col., 2010). La proteína PSF participa en la supervivencia y el crecimiento de células de cáncer de colon (Tsukahara y col., 2013) y sprouty interviene en la regulación del cáncer de próstata (Patel y col., 2013) siendo también factor pronóstico en cáncer de mama, especialmente en pacientes tratados con trastuzumab (Faratian y col., 2011).

La obtención de aptámeros, inhibidores y agentes bloqueantes de MNK y eIF4E, aplicados solos o combinados entre ellos, constituyen estrategias esperanzadoras para el tratamiento del cáncer de mama, especialmente en aquellos subtipos moleculares en los que, por sus características, los tratamientos actuales no son efectivos.

CONCLUSIONES

1. La proteína quinasa MNK1b puede considerarse un marcador de tumores HER2 negativos, ya que existe una correlación inversa entre la sobreexpresión de HER2 y la de MNK1b en tumores de mama. El aumento en la expresión de MNK1b podría deberse a alteraciones en la funcionalidad de las proteínas reguladoras y/o a mutaciones en el mRNA, que estimulen el procesamiento alternativo.
2. No existe una correlación entre la fosforilación global del eIF4E en las células tumorales y los niveles de expresión de MNK1b. Sin embargo, no puede descartarse la participación de MNK1b en la fosforilación diferencial del eIF4E en los distintos compartimentos celulares o en la fosforilación de otros posibles sustratos aún sin identificar.
3. La vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR/4E-BP1, que regula la disponibilidad del eIF4E a través de la fosforilación de 4E-BP1, parece ser la máxima responsable de los altos niveles de fosforilación del eIF4E en las células BT474, en las que las vías de las MAPKs están inhibidas. En este caso, las quinasas responsables de la fosforilación del eIF4E serían MNK1b y/o MNK2, que tienen una actividad independiente de fosforilación por las MAPKs.
4. Los aptámeros apMNK2F y apMNK3R pueden considerarse buenos candidatos para ser utilizados como moléculas de biorreconocimiento en sistemas diagnósticos de tumores de mama, ya que, aunque reconocen las dos isoformas de MNK1, se unen a MNK1b con mayor afinidad. Este hecho se debe a que el dominio de unión de los aptámeros a la quinasa está localizado en la región comprendida entre los aminoácidos comunes a ambas isoformas y la región específica de MNK1b (MNK1bSR).
5. Los aptámeros apMNK2F, apMNK3R y apMNK4R podrían ser utilizados en el futuro desarrollo de sistemas terapéuticos, ya que son capaces de disminuir la proliferación y capacidad clonogénica de células de cáncer de mama.

BIBLIOGRAFÍA

- Armengol, G., Rojo, F., Castellvi, J., Iglesias, C., Cuatrecasas, M., Pons, B., Baselga, J., y Ramon y Cajal, S. (2007). 4E-binding protein 1: a key molecular "funnel factor" in human cancer with clinical implications. *Cancer Res* 67, 7551-7555.
- Astanehe, A., Finkbeiner, M.R., Krzywinski, M., Fotovati, A., Dhillon, J., Berquin, I.M., Mills, G.B., Marra, M.A., y Dunn, S.E. (2012). MKNK1 is a YB-1 target gene responsible for imparting trastuzumab resistance and can be blocked by RSK inhibition. *Oncogene* 31, 4434-4446.
- Avdulov, S., Li, S., Michalek, V., Burrichter, D., Peterson, M., Perlman, D.M., Manivel, J.C., Sonenberg, N., Yee, D., Bitterman, P.B., y col. (2004). Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells. *Cancer Cell* 5, 553-563.
- Bachman, K.E., Argani, P., Samuels, Y., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Konishi, H., Karakas, B., Blair, B.G., Lin, C., y col. (2004). The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther* 3, 772-775.
- Bagalkot, V., Farokhzad, O.C., Langer, R., y Jon, S. (2006). An aptamer-doxorubicin physical conjugate as a novel targeted drug-delivery platform. *Angew Chem Int Ed Engl* 45, 8149-8152.
- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S., Alessi, D.R., y Cohen, P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 408, 297-315.
- Balogh, Z., Lautner, G., Bardoczy, V., Komorowska, B., Gyurcsanyi, R.E., y Meszaros, T. (2010). Selection and versatile application of virus-specific aptamers. *FASEB J* 24, 4187-4195.
- Bargou, R.C., Jurchott, K., Wagener, C., Bergmann, S., Metzner, S., Bommert, K., Mapara, M.Y., Winzer, K.J., Dietel, M., Dorken, B., y col. (1997). Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nat Med* 3, 447-450.
- Bates, P.J., Laber, D.A., Miller, D.M., Thomas, S.D., y Trent, J.O. (2009). Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Exp Mol Pathol* 86, 151-164.
- Benlimame, N., He, Q., Jie, S., Xiao, D., Xu, Y.J., Loignon, M., Schlaepfer, D.D., y Alaoui-Jamali, M.A. (2005). FAK signaling is critical for ErbB-2/ErbB-3 receptor cooperation for oncogenic transformation and invasion. *J Cell Biol* 171, 505-516.
- Berens, C., Thain, A., y Schroeder, R. (2001). A tetracycline-binding RNA aptamer. *Bioorg Med Chem* 9, 2549-2556.
- Bianchini, A., Loiarro, M., Bielli, P., Busa, R., Paronetto, M.P., Loreni, F., Geremia, R., y Sette, C. (2008). Phosphorylation of eIF4E by MNKs supports protein synthesis, cell cycle progression and proliferation in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 29, 2279-2288.

Bibliografía

- Bianchini, M., Radrizzani, M., Brocardo, M.G., Reyes, G.B., Gonzalez Solveyra, C., y Santa-Coloma, T.A. (2001). Specific oligobodies against ERK-2 that recognize both the native and the denatured state of the protein. *J Immunol Methods* 252, 191-197.
- Bilanges, B., y Stokoe, D. (2007). Mechanisms of translational deregulation in human tumors and therapeutic intervention strategies. *Oncogene* 26, 5973-5990.
- Bock, C., Coleman, M., Collins, B., Davis, J., Foulds, G., Gold, L., Greef, C., Heil, J., Heilig, J.S., Hicke, B., y *col.* (2004). Photoaptamer arrays applied to multiplexed proteomic analysis. *Proteomics* 4, 609-618.
- Bonomi, S., Gallo, S., Catillo, M., Pignataro, D., Biamonti, G., y Ghigna, C. (2013). Oncogenic alternative splicing switches: role in cancer progression and prospects for therapy. *Int J Cell Biol* 2013, 962038.
- Borden, K.L., y Culjkovic-Kraljacic, B. (2010). Ribavirin as an anti-cancer therapy: acute myeloid leukemia and beyond? *Leuk Lymphoma* 51, 1805-1815.
- Bosch, A., Eroles, P., Zaragoza, R., Vina, J.R., y Lluch, A. (2010). Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev* 36, 206-215.
- Brachmann, S., Fritsch, C., Maira, S.M., y Garcia-Echeverria, C. (2009). PI3K and mTOR inhibitors: a new generation of targeted anticancer agents. *Curr Opin Cell Biol* 21, 194-198.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brody, E.N., Willis, M.C., Smith, J.D., Jayasena, S., Zichi, D., y Gold, L. (1999). The use of aptamers in large arrays for molecular diagnostics. *Mol Diagn* 4, 381-388.
- Bundschu, K., Walter, U., y Schuh, K. (2006). The VASP-Spred-Sprouty domain puzzle. *J Biol Chem* 281, 36477-36481.
- Buxade, M., Morrice, N., Krebs, D.L., y Proud, C.G. (2008a). The PSF.p54nrb complex is a novel Mnk substrate that binds the mRNA for tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* 283, 57-65.
- Buxade, M., Parra-Palau, J.L., y Proud, C.G. (2008b). The Mnks: MAP kinase-interacting kinases (MAP kinase signal-integrating kinases). *Front Biosci* 13, 5359-5373.
- Buxade, M., Parra, J.L., Rousseau, S., Shpiro, N., Marquez, R., Morrice, N., Bain, J., Espel, E., y Proud, C.G. (2005). The Mnks are novel components in the control of TNF alpha biosynthesis and phosphorylate and regulate hnRNP A1. *Immunity* 23, 177-189.
- Byrnes, K., White, S., Chu, Q., Meschonat, C., Yu, H., Johnson, L.W., Debenedetti, A., Abreo, F., Turnage, R.H., McDonald, J.C., y *col.* (2006). High eIF4E, VEGF, and microvessel density in stage I to III breast cancer. *Ann Surg* 243, 684-690; discussion 691-682.

- Cargnello, M., y Roux, P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 50-83.
- Conrad, R., Keranen, L.M., Ellington, A.D., y Newton, A.C. (1994). Isozyme-specific inhibition of protein kinase C by RNA aptamers. *The Journal of biological chemistry* 269, 32051-32054.
- Costa, F., y F, J.B. (2007). [Treatment of non-small cell lung cancer in elderly patients]. *Rev Port Pneumol* 13, 841-854.
- Coughlin, S.S., y Ekwueme, D.U. (2009). Breast cancer as a global health concern. *Cancer Epidemiol* 33, 315-318.
- Cruz-Aguado, J.A., y Penner, G. (2008). Determination of ochratoxin a with a DNA aptamer. *J Agric Food Chem* 56, 10456-10461.
- Culjkovic-Kraljacic, B., Baguet, A., Volpon, L., Amri, A., y Borden, K.L. (2012). The oncogene eIF4E reprograms the nuclear pore complex to promote mRNA export and oncogenic transformation. *Cell Rep* 2, 207-215.
- Culjkovic, B., y Borden, K.L. (2009). Understanding and Targeting the Eukaryotic Translation Initiation Factor eIF4E in Head and Neck Cancer. *J Oncol* 2009, 981679.
- Culjkovic, B., Topisirovic, I., y Borden, K.L. (2007). Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Cell Cycle* 6, 65-69.
- Culjkovic, B., Topisirovic, I., Skrabanek, L., Ruiz-Gutierrez, M., y Borden, K.L. (2005). eIF4E promotes nuclear export of cyclin D1 mRNAs via an element in the 3'UTR. *J Cell Biol* 169, 245-256.
- Culjkovic, B., Topisirovic, I., Skrabanek, L., Ruiz-Gutierrez, M., y Borden, K.L. (2006). eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. *J Cell Biol* 175, 415-426.
- Chakravarthy, U., Adamis, A.P., Cunningham, E.T., Jr., Goldbaum, M., Guyer, D.R., Katz, B., y Patel, M. (2006). Year 2 efficacy results of 2 randomized controlled clinical trials of pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 113, 1508 e1501-1525.
- Chan, M.Y., Rusconi, C.P., Alexander, J.H., Tonkens, R.M., Harrington, R.A., y Becker, R.C. (2008). A randomized, repeat-dose, pharmacodynamic and safety study of an antidote-controlled factor IXa inhibitor. *J Thromb Haemost* 6, 789-796.
- Chappell, W.H., Steelman, L.S., Long, J.M., Kempf, R.C., Abrams, S.L., Franklin, R.A., Basecke, J., Stivala, F., Donia, M., Fagone, P., y col. (2011). Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget* 2, 135-164.
- Charlton, J., Sennello, J., y Smith, D. (1997). In vivo imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase. *Chem Biol* 4, 809-816.

Bibliografía

- Chen, F., Zhou, J., Luo, F., Mohammed, A.B., y Zhang, X.L. (2007). Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem Biophys Res Commun* 357, 743-748.
- Chen, J., Martin, B.L., y Brautigan, D.L. (1992). Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science* 257, 1261-1264.
- Chen, W., Possemato, R., Campbell, K.T., Plattner, C.A., Pallas, D.C., y Hahn, W.C. (2004). Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation. *Cancer Cell* 5, 127-136.
- Chrestensen, C.A., Eschenroeder, A., Ross, W.G., Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fukunaga, R., y Sturgill, T.W. (2007a). Loss of MNK function sensitizes fibroblasts to serum-withdrawal induced apoptosis. *Genes Cells* 12, 1133-1140.
- Chrestensen, C.A., Shuman, J.K., Eschenroeder, A., Worthington, M., Gram, H., y Sturgill, T.W. (2007b). MNK1 and MNK2 regulation in HER2-overexpressing breast cancer lines. *J Biol Chem* 282, 4243-4252.
- Chu, T.C., Marks, J.W., 3rd, Lavery, L.A., Faulkner, S., Rosenblum, M.G., Ellington, A.D., y Levy, M. (2006a). Aptamer:toxin conjugates that specifically target prostate tumor cells. *Cancer Res* 66, 5989-5992.
- Chu, T.C., Twu, K.Y., Ellington, A.D., y Levy, M. (2006b). Aptamer mediated siRNA delivery. *Nucleic Acids Res* 34, e73.
- Daniels, D.A., Chen, H., Hicke, B.J., Swiderek, K.M., y Gold, L. (2003). A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15416-15421.
- Das, S., Chattopadhyay, R., Bhakat, K.K., Boldogh, I., Kohno, K., Prasad, R., Wilson, S.H., y Hazra, T.K. (2007). Stimulation of NEIL2-mediated oxidized base excision repair via YB-1 interaction during oxidative stress. *J Biol Chem* 282, 28474-28484.
- DaSilva, J., Xu, L., Kim, H.J., Miller, W.T., y Bar-Sagi, D. (2006). Regulation of sprouty stability by Mnk1-dependent phosphorylation. *Mol Cell Biol* 26, 1898-1907.
- David, C.J., y Manley, J.L. (2010). Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes Dev* 24, 2343-2364.
- Davis, J.P., Janjic, N., Javornik, B.E., y Zichi, D.A. (1996). Identifying consensus patterns and secondary structure in SELEX sequence sets. *Methods Enzymol* 267, 302-314.
- De Benedetti, A., y Graff, J.R. (2004). eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* 23, 3189-3199.
- Denizot, F., y Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89, 271-277.

- Dey, N., Young, B., Abramovitz, M., Bouzyk, M., Barwick, B., De, P., y Leyland-Jones, B. (2013). Differential activation of Wnt-beta-catenin pathway in triple negative breast cancer increases MMP7 in a PTEN dependent manner. *PLoS One* 8, e77425.
- Diener, J.L., Daniel Lagasse, H.A., Duerschmied, D., Merhi, Y., Tanguay, J.F., Hutabarat, R., Gilbert, J., Wagner, D.D., y Schaub, R. (2009). Inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet activation and thrombosis by the anti-von Willebrand factor A1-domain aptamer ARC1779. *J Thromb Haemost* 7, 1155-1162.
- Dostie, J., Ferraiuolo, M., Pause, A., Adam, S.A., y Sonenberg, N. (2000). A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *EMBO J* 19, 3142-3156.
- Drolet, D.W., Moon-McDermott, L., y Romig, T.S. (1996). An enzyme-linked oligonucleotide assay. *Nat Biotechnol* 14, 1021-1025.
- Duncan, R., Milburn, S.C., y Hershey, J.W. (1987). Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F. *J Biol Chem* 262, 380-388.
- Ellington, A.D., y Szostak, J.W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818-822.
- En-Nia, A., Yilmaz, E., Klinge, U., Lovett, D.H., Stefanidis, I., y Mertens, P.R. (2005). Transcription factor YB-1 mediates DNA polymerase alpha gene expression. *J Biol Chem* 280, 7702-7711.
- Eroles, P., Bosch, A., Perez-Fidalgo, J.A., y Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev* 38, 698-707.
- Evdokimova, V., Tognon, C., Ng, T., Ruzanov, P., Melnyk, N., Fink, D., Sorokin, A., Ovchinnikov, L.P., Davicioni, E., Triche, T.J., y *col.* (2009). Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Cell* 15, 402-415.
- Fan, S., Ramalingam, S.S., Kauh, J., Xu, Z., Khuri, F.R., y Sun, S.Y. (2009). Phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 4 (eIF4E) is elevated in human cancer tissues. *Cancer Biol Ther* 8, 1463-1469.
- Faratian, D., Sims, A.H., Mullen, P., Kay, C., Um, I., Langdon, S.P., y Harrison, D.J. (2011). Sprouty 2 is an independent prognostic factor in breast cancer and may be useful in stratifying patients for trastuzumab therapy. *PLoS One* 6, e23772.
- Ferraiuolo, M.A., Basak, S., Dostie, J., Murray, E.L., Schoenberg, D.R., y Sonenberg, N. (2005). A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. *J Cell Biol* 170, 913-924.
- Ferreira, C.S., Papamichael, K., Guilbault, G., Schwarzacher, T., Gariepy, J., y Missailidis, S. (2008). DNA aptamers against the MUC1 tumour marker: design of aptamer-antibody sandwich ELISA for the early diagnosis of epithelial tumours. *Anal Bioanal Chem* 390, 1039-1050.

Bibliografía

- Flynn, A., y Proud, C.G. (1995). Serine 209, not serine 53, is the major site of phosphorylation in initiation factor eIF-4E in serum-treated Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **270**, 21684-21688.
- Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., y van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* **1**, 2315-2319.
- Fukazawa, H., Noguchi, K., Murakami, Y., y Uehara, Y. (2002). Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) inhibitors restore anoikis sensitivity in human breast cancer cell lines with a constitutively activated extracellular-regulated kinase (ERK) pathway. *Mol Cancer Ther* **1**, 303-309.
- Fukunaga, R., y Hunter, T. (1997). MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J* **16**, 1921-1933.
- Gerdes, J., Li, L., Schlueter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Gerlach, C., Stahmer, I., Kloth, S., Brandt, E., y Flad, H.D. (1991). Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* **138**, 867-873.
- Ghigna, C., Valacca, C., y Biamonti, G. (2008). Alternative splicing and tumor progression. *Curr Genomics* **9**, 556-570.
- Gimenez-Bonafe, P., Fedoruk, M.N., Whitmore, T.G., Akbari, M., Ralph, J.L., Ettinger, S., Gleave, M.E., y Nelson, C.C. (2004). YB-1 is upregulated during prostate cancer tumor progression and increases P-glycoprotein activity. *Prostate* **59**, 337-349.
- Gingras, A.C., Raught, B., y Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* **68**, 913-963.
- Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., Gelber, R.D., Thurlimann, B., y Senn, H.J. (2011). Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* **22**, 1736-1747.
- Gopalakrishna, R., Gundimeda, U., Fontana, J.A., y Clarke, R. (1999). Differential distribution of protein phosphatase 2A in human breast carcinoma cell lines and its relation to estrogen receptor status. *Cancer Lett* **136**, 143-151.
- Goto, S., Yao, Z., y Proud, C.G. (2009). The C-terminal domain of Mnk1a plays a dual role in tightly regulating its activity. *Biochem J* **423**, 279-290.
- Graff, J.R., Boghaert, E.R., De Benedetti, A., Tudor, D.L., Zimmer, C.C., Chan, S.K., y Zimmer, S.G. (1995). Reduction of translation initiation factor 4E decreases the malignancy of ras-transformed cloned rat embryo fibroblasts. *Int J Cancer* **60**, 255-263.
- Grate, D., y Wilson, C. (2001). Inducible regulation of the *S. cerevisiae* cell cycle mediated by an RNA aptamer-ligand complex. *Bioorg Med Chem* **9**, 2565-2570.

- Grzmil, M., Morin, P., Jr., Lino, M.M., Merlo, A., Frank, S., Wang, Y., Moncayo, G., y Hemmings, B.A. (2011). MAP kinase-interacting kinase 1 regulates SMAD2-dependent TGF-beta signaling pathway in human glioblastoma. *Cancer Res* 71, 2392-2402.
- He, C., Zhou, F., Zuo, Z., Cheng, H., y Zhou, R. (2009). A global view of cancer-specific transcript variants by subtractive transcriptome-wide analysis. *PLoS One* 4, e4732.
- Hefner, Y., Borsch-Haubold, A.G., Murakami, M., Wilde, J.I., Pasquet, S., Schieltz, D., Ghomashchi, F., Yates, J.R., 3rd, Armstrong, C.G., Paterson, A., y *col.* (2000). Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by MNK1-related protein kinases. *J Biol Chem* 275, 37542-37551.
- Hermann, T., y Patel, D.J. (2000). Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* 287, 820-825.
- Hofmann, H.P., Limmer, S., Hornung, V., y Sprinzl, M. (1997). Ni²⁺-binding RNA motifs with an asymmetric purine-rich internal loop and a G-A base pair. *RNA* 3, 1289-1300.
- Holm, N., Byrnes, K., Johnson, L., Abreo, F., Sehon, K., Alley, J., Meschonat, C., Md, Q.C., y Li, B.D. (2008). A prospective trial on initiation factor 4E (eIF4E) overexpression and cancer recurrence in node-negative breast cancer. *Ann Surg Oncol* 15, 3207-3215.
- Hollestelle, A., Nagel, J.H., Smid, M., Lam, S., Elstrodt, F., Wasielewski, M., Ng, S.S., French, P.J., Peeters, J.K., Rozendaal, M.J., y *col.* (2010). Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 121, 53-64.
- Horton, L.E., Bushell, M., Barth-Baus, D., Tilleray, V.J., Clemens, M.J., y Hensold, J.O. (2002). p53 activation results in rapid dephosphorylation of the eIF4E-binding protein 4E-BP1, inhibition of ribosomal protein S6 kinase and inhibition of translation initiation. *Oncogene* 21, 5325-5334.
- Hoshino, R., Chatani, Y., Yamori, T., Tsuruo, T., Oka, H., Yoshida, O., Shimada, Y., Ari-i, S., Wada, H., Fujimoto, J., y *col.* (1999). Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 18, 813-822.
- Hou, J., Lam, F., Proud, C., y Wang, S. (2012). Targeting Mnks for cancer therapy. *Oncotarget* 3, 118-131.
- Huang, C.S., Shen, C.Y., Wang, H.W., Wu, P.E., y Cheng, C.W. (2007). Increased expression of SRp40 affecting CD44 splicing is associated with the clinical outcome of lymph node metastasis in human breast cancer. *Clin Chim Acta* 384, 69-74.
- Huang, Y.F., Chang, H.T., y Tan, W. (2008). Cancer cell targeting using multiple aptamers conjugated on nanorods. *Anal Chem* 80, 567-572.
- Jauch, R., Cho, M.K., Jakel, S., Netter, C., Schreiter, K., Aicher, B., Zweckstetter, M., Jackle, H., y Wahl, M.C. (2006). Mitogen-activated protein kinases interacting kinases are autoinhibited by a reprogrammed activation segment. *EMBO J* 25, 4020-4032.

Bibliografía

- Jauch, R., Jakel, S., Netter, C., Schreiter, K., Aicher, B., Jackle, H., y Wahl, M.C. (2005). Crystal structures of the Mnk2 kinase domain reveal an inhibitory conformation and a zinc binding site. *Structure* 13, 1559-1568.
- Jayasena, S.D. (1999). Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem* 45, 1628-1650.
- Joshi, B., Cai, A.L., Keiper, B.D., Minich, W.B., Mendez, R., Beach, C.M., Stepinski, J., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E., y Rhoads, R.E. (1995). Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E at Ser-209. *J Biol Chem* 270, 14597-14603.
- Joshi, S., y Platanias, L.C. (2012). Mnk Kinases in Cytokine Signaling and Regulation of Cytokine Responses. *Biomol Concepts* 3, 127-139.
- Kamura, T., Yahata, H., Amada, S., Ogawa, S., Sonoda, T., Kobayashi, H., Mitsumoto, M., Kohno, K., Kuwano, M., y Nakano, H. (1999). Is nuclear expression of Y box-binding protein-1 a new prognostic factor in ovarian serous adenocarcinoma? *Cancer* 85, 2450-2454.
- Kang, S., Bader, A.G., y Vogt, P.K. (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 802-807.
- Keen, J.C., Zhou, Q., Park, B.H., Pettit, C., Mack, K.M., Blair, B., Brenner, K., y Davidson, N.E. (2005). Protein phosphatase 2A regulates estrogen receptor alpha (ER) expression through modulation of ER mRNA stability. *J Biol Chem* 280, 29519-29524.
- Kharmate, G., Rajput, P.S., Lin, Y.C., y Kumar, U. (2013). Inhibition of tumor promoting signals by activation of SSTR2 and opioid receptors in human breast cancer cells. *Cancer Cell Int* 13, 93.
- Kjellerup, R.B., Kragballe, K., Iversen, L., y Johansen, C. (2008). Pro-inflammatory cytokine release in keratinocytes is mediated through the MAPK signal-integrating kinases. *Exp Dermatol* 17, 498-504.
- Knauf, U., Tschopp, C., y Gram, H. (2001). Negative regulation of protein translation by mitogen-activated protein kinase-interacting kinases 1 and 2. *Mol Cell Biol* 21, 5500-5511.
- Konicek, B.W., Stephens, J.R., McNulty, A.M., Robichaud, N., Peery, R.B., Dumstorf, C.A., Dowless, M.S., Iversen, P.W., Parsons, S., Ellis, K.E., y *col.* (2011). Therapeutic inhibition of MAP kinase interacting kinase blocks eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation and suppresses outgrowth of experimental lung metastases. *Cancer Res* 71, 1849-1857.
- Kulbachinskiy, A.V. (2007). Methods for selection of aptamers to protein targets. *Biochemistry (Mosc)* 72, 1505-1518.
- Lal, S., Allan, A., Markovic, D., Walker, R., Macartney, J., Europe-Finner, N., Tyson-Capper, A., y Grammatopoulos, D.K. (2013). Estrogen alters the splicing of type 1 corticotropin-releasing hormone receptor in breast cancer cells. *Sci Signal* 6, ra53.
- Lamphear, B.J., Kirchweger, R., Skern, T., y Rhoads, R.E. (1995). Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases.

- Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J Biol Chem* 270, 21975-21983.
- Lasham, A., Samuel, W., Cao, H., Patel, R., Mehta, R., Stern, J.L., Reid, G., Woolley, A.G., Miller, L.D., Black, M.A., y col. (2011). YB-1, the E2F pathway, and regulation of tumor cell growth. *J Natl Cancer Inst* 104, 133-146.
- Lazaris-Karatzas, A., Montine, K.S., y Sonenberg, N. (1990). Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature* 345, 544-547.
- Lejbkiewicz, F., Goyer, C., Darveau, A., Neron, S., Lemieux, R., y Sonenberg, N. (1992). A fraction of the mRNA 5' cap-binding protein, eukaryotic initiation factor 4E, localizes to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9612-9616.
- Li, B.D., Gruner, J.S., Abreo, F., Johnson, L.W., Yu, H., Nawas, S., McDonald, J.C., y DeBenedetti, A. (2002). Prospective study of eukaryotic initiation factor 4E protein elevation and breast cancer outcome. *Ann Surg* 235, 732-738; discussion 738-739.
- Li, Y., Yue, P., Deng, X., Ueda, T., Fukunaga, R., Khuri, F.R., y Sun, S.Y. (2010). Protein phosphatase 2A negatively regulates eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation and eIF4F assembly through direct dephosphorylation of Mnk and eIF4E. *Neoplasia* 12, 848-855.
- Lin, T.A., Kong, X., Haystead, T.A., Pause, A., Belsham, G., Sonenberg, N., y Lawrence, J.C., Jr. (1994). PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Science* 266, 653-656.
- Liss, M., Petersen, B., Wolf, H., y Prohaska, E. (2002). An aptamer-based quartz crystal protein biosensor. *Anal Chem* 74, 4488-4495.
- Longin, S., Zwaenepoel, K., Louis, J.V., Dilworth, S., Goris, J., y Janssens, V. (2007). Selection of protein phosphatase 2A regulatory subunits is mediated by the C terminus of the catalytic Subunit. *J Biol Chem* 282, 26971-26980.
- Maasch, C., Buchner, K., Eulberg, D., Vonhoff, S., y Klussmann, S. (2008). Physicochemical stability of NOX-E36, a 40mer L-RNA (Spiegelmer) for therapeutic applications. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 61-62.
- Makkinje, A., Xiong, H., Li, M., y Damuni, Z. (1995). Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E by insulin-stimulated protamine kinase. *J Biol Chem* 270, 14824-14828.
- Mallikaratchy, P., Tang, Z., Kwame, S., Meng, L., Shangguan, D., y Tan, W. (2007). Aptamer directly evolved from live cells recognizes membrane bound immunoglobulin heavy mu chain in Burkitt's lymphoma cells. *Mol Cell Proteomics* 6, 2230-2238.
- Marcotrigiano, J., Gingras, A.C., Sonenberg, N., y Burley, S.K. (1999). Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol Cell* 3, 707-716.

Bibliografía

- Masud, M.M., Kuwahara, M., Ozaki, H., y Sawai, H. (2004). Sialyllactose-binding modified DNA aptamer bearing additional functionality by SELEX. *Bioorg Med Chem* 12, 1111-1120.
- McClusky, D.R., Chu, Q., Yu, H., Debenedetti, A., Johnson, L.W., Meschonat, C., Turnage, R., McDonald, J.C., Abreo, F., y Li, B.D. (2005). A prospective trial on initiation factor 4E (eIF4E) overexpression and cancer recurrence in node-positive breast cancer. *Ann Surg* 242, 584-590; discussion 590-582.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Kempf, C.R., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Stivala, F., Malaponte, G., Nicoletti, F., Libra, M., Basecke, J., y col. (2011). Therapeutic resistance resulting from mutations in Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR signaling pathways. *J Cell Physiol* 226, 2762-2781.
- McKeague, M., y Derosa, M.C. (2012). Challenges and opportunities for small molecule aptamer development. *J Nucleic Acids* 2012, 748913.
- McKendrick, L., Thompson, E., Ferreira, J., Morley, S.J., y Lewis, J.D. (2001). Interaction of eukaryotic translation initiation factor 4G with the nuclear cap-binding complex provides a link between nuclear and cytoplasmic functions of the m(7) guanosine cap. *Mol Cell Biol* 21, 3632-3641.
- McNamara, J.O., 2nd, Andrechek, E.R., Wang, Y., Viles, K.D., Rempel, R.E., Gilboa, E., Sullenger, B.A., y Giangrande, P.H. (2006). Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotechnol* 24, 1005-1015.
- Meric-Bernstam, F., y Gonzalez-Angulo, A.M. (2009). Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *J Clin Oncol* 27, 2278-2287.
- Mertens, P.R., Harendza, S., Pollock, A.S., y Lovett, D.H. (1997). Glomerular mesangial cell-specific transactivation of matrix metalloproteinase 2 transcription is mediated by YB-1. *J Biol Chem* 272, 22905-22912.
- Michaud, M., Jourdan, E., Villet, A., Ravel, A., Grosset, C., y Peyrin, E. (2003). A DNA aptamer as a new target-specific chiral selector for HPLC. *J Am Chem Soc* 125, 8672-8679.
- Miyakawa, S., Oguro, A., Ohtsu, T., Imataka, H., Sonenberg, N., y Nakamura, Y. (2006). RNA aptamers to mammalian initiation factor 4G inhibit cap-dependent translation by blocking the formation of initiation factor complexes. *RNA* 12, 1825-1834.
- Mochizuki, K., Oguro, A., Ohtsu, T., Sonenberg, N., y Nakamura, Y. (2005). High affinity RNA for mammalian initiation factor 4E interferes with mRNA-cap binding and inhibits translation. *RNA* 11, 77-89.
- Morley, S.J., y Naegele, S. (2002). Phosphorylation of eukaryotic initiation factor (eIF) 4E is not required for de novo protein synthesis following recovery from hypertonic stress in human kidney cells. *J Biol Chem* 277, 32855-32859.
- Morley, S.J., y Naegele, S. (2003). Phosphorylation of initiation factor 4E is resistant to SB203580 in cells expressing a drug-resistant mutant of stress-activated protein kinase 2a/p38. *Cell Signal* 15, 741-749.

- Muller, J., El-Maarri, O., Oldenburg, J., Potzsch, B., y Mayer, G. (2008). Monitoring the progression of the in vitro selection of nucleic acid aptamers by denaturing high-performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* 390, 1033-1037.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., y Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24, 17-27.
- Murphy, M.B., Fuller, S.T., Richardson, P.M., y Doyle, S.A. (2003). An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification. *Nucleic Acids Res* 31, e110.
- Nagel-Wolfrum, K., Buerger, C., Wittig, I., Butz, K., Hoppe-Seyler, F., y Groner, B. (2004). The interaction of specific peptide aptamers with the DNA binding domain and the dimerization domain of the transcription factor Stat3 inhibits transactivation and induces apoptosis in tumor cells. *Mol Cancer Res* 2, 170-182.
- Nimjee, S.M., Rusconi, C.P., y Sullenger, B.A. (2005). Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annu Rev Med* 56, 555-583.
- O'Loughlen, A., Gonzalez, V.M., Jurado, T., Salinas, M., y Martin, M.E. (2007). Characterization of the activity of human MAP kinase-interacting kinase Mnk1b. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1416-1427.
- O'Loughlen, A., Gonzalez, V.M., Pineiro, D., Perez-Morgado, M.I., Salinas, M., y Martin, M.E. (2004a). Identification and molecular characterization of Mnk1b, a splice variant of human MAP kinase-interacting kinase Mnk1. *Exp Cell Res* 299, 343-355.
- O'Loughlen, A., Gonzalez, V.M., Salinas, M., y Martin, M.E. (2004b). Suppression of human Mnk1 by small interfering RNA increases the eukaryotic initiation factor 4F activity in HEK293T cells. *FEBS Lett* 578, 31-35.
- O'Loughlen, A., Perez-Morgado, M.I., Salinas, M., y Martin, M.E. (2006). N-acetyl-cysteine abolishes hydrogen peroxide-induced modification of eukaryotic initiation factor 4F activity via distinct signalling pathways. *Cell Signal* 18, 21-31.
- Oguro, A., Ohtsu, T., y Nakamura, Y. (2009). An aptamer-based biosensor for mammalian initiation factor eukaryotic initiation factor 4A. *Anal Biochem* 388, 102-107.
- Olsson, E., Honeth, G., Bendahl, P.O., Saal, L.H., Gruvberger-Saal, S., Ringner, M., Vallon-Christersson, J., Jonsson, G., Holm, K., Lovgren, K., y col. (2011). CD44 isoforms are heterogeneously expressed in breast cancer and correlate with tumor subtypes and cancer stem cell markers. *BMC Cancer* 11, 418.
- Orton, K.C., Ling, J., Waskiewicz, A.J., Cooper, J.A., Merrick, W.C., Korneeva, N.L., Rhoads, R.E., Sonenberg, N., y Traugh, J.A. (2004). Phosphorylation of Mnk1 by caspase-activated Pak2/gamma-PAK inhibits phosphorylation and interaction of eIF4G with Mnk. *J Biol Chem* 279, 38649-38657.

Bibliografía

- Ossovskaia, V., Wang, Y., Budoff, A., Xu, Q., Lituev, A., Potapova, O., Vansant, G., Monforte, J., y Daraselia, N. (2011). Exploring molecular pathways of triple-negative breast cancer. *Genes Cancer* 2, 870-879.
- Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J., y Blencowe, B.J. (2008). Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet* 40, 1413-1415.
- Parker, R., y Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 25, 635-646.
- Parra-Palau, J.L., Scheper, G.C., Wilson, M.L., y Proud, C.G. (2003). Features in the N and C termini of the MAPK-interacting kinase Mnk1 mediate its nucleocytoplasmic shuttling. *J Biol Chem* 278, 44197-44204.
- Parra, J.L., Buxade, M., y Proud, C.G. (2005). Features of the catalytic domains and C termini of the MAPK signal-integrating kinases Mnk1 and Mnk2 determine their differing activities and regulatory properties. *J Biol Chem* 280, 37623-37633.
- Patel, R., Gao, M., Ahmad, I., Fleming, J., Singh, L.B., Rai, T.S., McKie, A.B., Seywright, M., Barnettson, R.J., Edwards, J., y col. (2013). Sprouty2, PTEN, and PP2A interact to regulate prostate cancer progression. *J Clin Invest* 123, 1157-1175.
- Pause, A., Belsham, G.J., Gingras, A.C., Donze, O., Lin, T.A., Lawrence, J.C., Jr., y Sonenberg, N. (1994). Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371, 762-767.
- Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., y col. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752.
- Pettersson, F., Yau, C., Dobocan, M.C., Culjkovic-Kraljacic, B., Retrouvey, H., Puckett, R., Flores, L.M., Krop, I.E., Rousseau, C., Cocolakis, E., y col. (2011). Ribavirin treatment effects on breast cancers overexpressing eIF4E, a biomarker with prognostic specificity for luminal B-type breast cancer. *Clin Cancer Res* 17, 2874-2884.
- Phillips, A., y Blaydes, J.P. (2008). MNK1 and EIF4E are downstream effectors of MEKs in the regulation of the nuclear export of HDM2 mRNA. *Oncogene* 27, 1645-1649.
- Phillips, J.A., Lopez-Colon, D., Zhu, Z., Xu, Y., y Tan, W. (2008). Applications of aptamers in cancer cell biology. *Anal Chim Acta* 621, 101-108.
- Piekielko-Witkowska, A., Wiszomirska, H., Wojcicka, A., Poplawski, P., Boguslawska, J., Tanski, Z., y Nauman, A. (2010). Disturbed expression of splicing factors in renal cancer affects alternative splicing of apoptosis regulators, oncogenes, and tumor suppressors. *PLoS One* 5, e13690.
- Pyronnet, S., Imataka, H., Gingras, A.C., Fukunaga, R., Hunter, T., y Sonenberg, N. (1999). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J* 18, 270-279.

- Rafehi, H., Orlowski, C., Georgiadis, G.T., Ververis, K., El-Osta, A., y Karagiannis, T.C. (2011). Clonogenic assay: adherent cells. *J Vis Exp*.
- Ramalingam, S., Gediya, L., Kwegyir-Afful, A.K., Ramamurthy, V.P., Purushottamachar, P., Mbatia, H., y Njar, V.C. (2014). First MNKs degrading agents block phosphorylation of eIF4E, induce apoptosis, inhibit cell growth, migration and invasion in triple negative and Her2-overexpressing breast cancer cell lines. *Oncotarget*.
- Raught, B., Gingras, A.C., y Sonenberg, N. (2000). Regulation of ribosomal recruitment in eukaryotes. In *Translational Control of Gene Expression*, C.S.H.L. Press, ed. (New York), pp. 245-293.
- Robertson, D.L., y Joyce, G.F. (1990). Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature* *344*, 467-468.
- Rojo, F., Najera, L., Lirola, J., Jimenez, J., Guzman, M., Sabadell, M.D., Baselga, J., y Ramon y Cajal, S. (2007). 4E-binding protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis. *Clin Cancer Res* *13*, 81-89.
- Rong, L., Livingstone, M., Sukarieh, R., Petroulakis, E., Gingras, A.C., Crosby, K., Smith, B., Polakiewicz, R.D., Pelletier, J., Ferraiuolo, M.A., y col. (2008). Control of eIF4E cellular localization by eIF4E-binding proteins, 4E-BPs. *RNA* *14*, 1318-1327.
- Ross, G., Dyer, J.R., Castellucci, V.F., y Sossin, W.S. (2006). Mnk is a negative regulator of cap-dependent translation in *Aplysia* neurons. *J Neurochem* *97*, 79-91.
- Rousseau, D., Kaspar, R., Rosenwald, I., Gehrke, L., y Sonenberg, N. (1996). Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 1065-1070.
- Roux, P.P., y Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* *68*, 320-344.
- Rowlett, R.M., Chrestensen, C.A., Nyce, M., Harp, M.G., Pelo, J.W., Cominelli, F., Ernst, P.B., Pizarro, T.T., Sturgill, T.W., y Worthington, M.T. (2008). MNK kinases regulate multiple TLR pathways and innate proinflammatory cytokines in macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *294*, G452-459.
- Rozen, F., Edery, I., Meerovitch, K., Dever, T.E., Merrick, W.C., y Sonenberg, N. (1990). Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol Cell Biol* *10*, 1134-1144.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., y Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* *230*, 1350-1354.
- Sangai, T., Akcakanat, A., Chen, H., Tarco, E., Wu, Y., Do, K.A., Miller, T.W., Arteaga, C.L., Mills, G.B., Gonzalez-Angulo, A.M., y col. (2012). Biomarkers of response to Akt inhibitor MK-2206 in breast cancer. *Clin Cancer Res* *18*, 5816-5828.

Bibliografía

- Sayyed, S.G., Hagele, H., Kulkarni, O.P., Endlich, K., Segerer, S., Eulberg, D., Klussmann, S., y Anders, H.J. (2009). Podocytes produce homeostatic chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12, which contributes to glomerulosclerosis, podocyte loss and albuminuria in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 52, 2445-2454.
- Sazani, P.L., Larralde, R., y Szostak, J.W. (2004). A small aptamer with strong and specific recognition of the triphosphate of ATP. *J Am Chem Soc* 126, 8370-8371.
- Scheper, G.C., Morrice, N.A., Kleijn, M., y Proud, C.G. (2001). The mitogen-activated protein kinase signal-integrating kinase Mnk2 is a eukaryotic initiation factor 4E kinase with high levels of basal activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 21, 743-754.
- Scheper, G.C., Parra, J.L., Wilson, M., Van Kollenburg, B., Vertegaal, A.C., Han, Z.G., y Proud, C.G. (2003). The N and C termini of the splice variants of the human mitogen-activated protein kinase-interacting kinase Mnk2 determine activity and localization. *Mol Cell Biol* 23, 5692-5705.
- Scheper, G.C., van Kollenburg, B., Hu, J., Luo, Y., Goss, D.J., y Proud, C.G. (2002). Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA. *J Biol Chem* 277, 3303-3309.
- Sefah, K., Tang, Z.W., Shangguan, D.H., Chen, H., Lopez-Colon, D., Li, Y., Parekh, P., Martin, J., Meng, L., Phillips, J.A., y *col.* (2009). Molecular recognition of acute myeloid leukemia using aptamers. *Leukemia* 23, 235-244.
- Shahbazian, D., Roux, P.P., Mieulet, V., Cohen, M.S., Raught, B., Taunton, J., Hershey, J.W., Blenis, J., Pende, M., y Sonenberg, N. (2006). The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO J* 25, 2781-2791.
- Shangguan, D., Li, Y., Tang, Z., Cao, Z.C., Chen, H.W., Mallikaratchy, P., Sefah, K., Yang, C.J., y Tan, W. (2006). Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11838-11843.
- Shibahara, K., Sugio, K., Osaki, T., Uchiumi, T., Maehara, Y., Kohno, K., Yasumoto, K., Sugimachi, K., y Kuwano, M. (2001). Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 7, 3151-3155.
- Slentz-Kesler, K., Moore, J.T., Lombard, M., Zhang, J., Hollingsworth, R., y Weiner, M.P. (2000). Identification of the human Mnk2 gene (MKNK2) through protein interaction with estrogen receptor beta. *Genomics* 69, 63-71.
- Slepenkov, S.V., Darzynkiewicz, E., y Rhoads, R.E. (2006). Stopped-flow kinetic analysis of eIF4E and phosphorylated eIF4E binding to cap analogs and capped oligoribonucleotides: evidence for a one-step binding mechanism. *J Biol Chem* 281, 14927-14938.
- Soni, A., Akcakanat, A., Singh, G., Luyimbazi, D., Zheng, Y., Kim, D., Gonzalez-Angulo, A., y Meric-Bernstam, F. (2008). eIF4E knockdown decreases breast cancer cell growth without activating Akt signaling. *Mol Cancer Ther* 7, 1782-1788.

- Sotiriou, C., Neo, S.Y., McShane, L.M., Korn, E.L., Long, P.M., Jazaeri, A., Martiat, P., Fox, S.B., Harris, A.L., y Liu, E.T. (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 10393-10398.
- Srebrow, A., y Kornblihtt, A.R. (2006). The connection between splicing and cancer. *J Cell Sci* *119*, 2635-2641.
- Stein, U., Jurchott, K., Walther, W., Bergmann, S., Schlag, P.M., y Royer, H.D. (2001). Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters. *J Biol Chem* *276*, 28562-28569.
- Stemke-Hale, K., Gonzalez-Angulo, A.M., Lluch, A., Neve, R.M., Kuo, W.L., Davies, M., Carey, M., Hu, Z., Guan, Y., Sahin, A., y *col.* (2008). An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res* *68*, 6084-6091.
- Stoltenburg, R., Reinemann, C., y Strehlitz, B. (2005). FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Anal Bioanal Chem* *383*, 83-91.
- Stoltenburg, R., Reinemann, C., y Strehlitz, B. (2007). SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng* *24*, 381-403.
- Stratford, A.L., Fry, C.J., Desilets, C., Davies, A.H., Cho, Y.Y., Li, Y., Dong, Z., Berquin, I.M., Roux, P.P., y Dunn, S.E. (2008). Y-box binding protein-1 serine 102 is a downstream target of p90 ribosomal S6 kinase in basal-like breast cancer cells. *Breast Cancer Res* *10*, R99.
- Svitkin, Y.V., Herdy, B., Costa-Mattioli, M., Gingras, A.C., Raught, B., y Sonenberg, N. (2005). Eukaryotic translation initiation factor 4E availability controls the switch between cap-dependent and internal ribosomal entry site-mediated translation. *Mol Cell Biol* *25*, 10556-10565.
- Svobodova, M., Pinto, A., Nadal, P., y CK, O.S. (2012). Comparison of different methods for generation of single-stranded DNA for SELEX processes. *Anal Bioanal Chem* *404*, 835-842.
- Tang, Z., Shangguan, D., Wang, K., Shi, H., Sefah, K., Mallikratchy, P., Chen, H.W., Li, Y., y Tan, W. (2007). Selection of aptamers for molecular recognition and characterization of cancer cells. *Anal Chem* *79*, 4900-4907.
- Thumma, S.C., y Kratzke, R.A. (2007). Translational control: a target for cancer therapy. *Cancer Lett* *258*, 1-8.
- Tombelli, S., Minunni, M., y Mascini, M. (2005). Analytical applications of aptamers. *Biosens Bioelectron* *20*, 2424-2434.
- Topisirovic, I., Ruiz-Gutierrez, M., y Borden, K.L. (2004). Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities. *Cancer Res* *64*, 8639-8642.

Bibliografía

- Topisirovic, I., Siddiqui, N., Lapointe, V.L., Trost, M., Thibault, P., Bangeranye, C., Pinol-Roma, S., y Borden, K.L. (2009). Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP. *EMBO J* 28, 1087-1098.
- Tsukahara, T., Haniu, H., y Matsuda, Y. (2013). PTB-associated splicing factor (PSF) is a PPARgamma-binding protein and growth regulator of colon cancer cells. *PLoS One* 8, e58749.
- Tuerk, C., y Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505-510.
- Ueda, T., Sasaki, M., Elia, A.J., Chio, II, Hamada, K., Fukunaga, R., y Mak, T.W. (2010). Combined deficiency for MAP kinase-interacting kinase 1 and 2 (Mnk1 and Mnk2) delays tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 13984-13990.
- Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fukuyama, H., Nagata, S., y Fukunaga, R. (2004). Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development. *Mol Cell Biol* 24, 6539-6549.
- van der Houven van Oordt, W., Diaz-Meco, M.T., Lozano, J., Krainer, A.R., Moscat, J., y Caceres, J.F. (2000). The MKK(3/6)-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation. *J Cell Biol* 149, 307-316.
- Wang, E.T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S.F., Schroth, G.P., y Burge, C.B. (2008a). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 456, 470-476.
- Wang, F., Han, C., He, C., Zhou, Q., Zhang, J., Wang, C., Li, N., y Huang, F. (2008b). Self-sorting organization of two heteroditopic monomers to supramolecular alternating copolymers. *J Am Chem Soc* 130, 11254-11255.
- Wang, G.L., Iakova, P., Wilde, M., Awad, S., y Timchenko, N.A. (2004). Liver tumors escape negative control of proliferation via PI3K/Akt-mediated block of C/EBP alpha growth inhibitory activity. *Genes Dev* 18, 912-925.
- Wang, X., Flynn, A., Waskiewicz, A.J., Webb, B.L., Vries, R.G., Baines, I.A., Cooper, J.A., y Proud, C.G. (1998). The phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF4E in response to phorbol esters, cell stresses, and cytokines is mediated by distinct MAP kinase pathways. *J Biol Chem* 273, 9373-9377.
- Wang, X., Yue, P., Chan, C.B., Ye, K., Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fukunaga, R., Fu, H., Khuri, F.R., y Sun, S.Y. (2007). Inhibition of mammalian target of rapamycin induces phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and Mnk-mediated eukaryotic translation initiation factor 4E phosphorylation. *Mol Cell Biol* 27, 7405-7413.
- Waskiewicz, A.J., Flynn, A., Proud, C.G., y Cooper, J.A. (1997). Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J* 16, 1909-1920.
- Waskiewicz, A.J., Johnson, J.C., Penn, B., Mahalingam, M., Kimball, S.R., y Cooper, J.A. (1999). Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Mol Cell Biol* 19, 1871-1880.

- Weigand, J.E., y Suess, B. (2009). Aptamers and riboswitches: perspectives in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 229-236.
- Wells, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D., y Sachs, A.B. (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell* 2, 135-140.
- Wendel, H.G., Silva, R.L., Malina, A., Mills, J.R., Zhu, H., Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fukunaga, R., Teruya-Feldstein, J., Pelletier, J., y col. (2007). Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes Dev* 21, 3232-3237.
- Wheater, M.J., Johnson, P.W., y Blaydes, J.P. (2010). The role of MNK proteins and eIF4E phosphorylation in breast cancer cell proliferation and survival. *Cancer Biol Ther* 10, 728-735.
- Wong, L.L., Chang, C.F., Koay, E.S., y Zhang, D. (2009). Tyrosine phosphorylation of PP2A is regulated by HER-2 signalling and correlates with breast cancer progression. *Int J Oncol* 34, 1291-1301.
- Wu, J., Lee, C., Yokom, D., Jiang, H., Cheang, M.C., Yorida, E., Turbin, D., Berquin, I.M., Mertens, P.R., Iftner, T., y col. (2006). Disruption of the Y-box binding protein-1 results in suppression of the epidermal growth factor receptor and HER-2. *Cancer Res* 66, 4872-4879.
- Yoon, S., y Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24, 21-44.
- Zhang, L., Yoo, S., Dritschilo, A., Belyaev, I., y Soldatenkov, V. (2004). Targeting Ku protein for sensitizing of breast cancer cells to DNA-damage. *Int J Mol Med* 14, 153-159.
- Zhang, M., Fu, W., Prabhu, S., Moore, J.C., Ko, J., Kim, J.W., Druker, B.J., Trapp, V., Fruehauf, J., Gram, H., y col. (2008). Inhibition of polysome assembly enhances imatinib activity against chronic myelogenous leukemia and overcomes imatinib resistance. *Mol Cell Biol* 28, 6496-6509.
- Zhang, Y.L., y Dong, C. (2005). MAP kinases in immune responses. *Cell Mol Immunol* 2, 20-27.
- Zhou, Z.J., Dai, Z., Zhou, S.L., Fu, X.T., Zhao, Y.M., Shi, Y.H., Zhou, J., y Fan, J. (2013). Overexpression of HnRNP A1 promotes tumor invasion through regulating CD44v6 and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 132, 1080-1089.

RESUMEN EN INGLÉS

INTRODUCTION

The human MAP kinase-interacting kinases, MNKs, comprise a group of four proteins derived from two genes by alternative splicing (*MNK1* and *MNK2*). Both MNK1a and MNK2a possess a longer C-terminal region than the “b” isoforms, which lack the MAP kinase-binding region. The N-termini of all the forms contains a polybasic region which binds importin α , and the scaffold protein, eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G). MNK isoforms differ markedly in their activity, regulation, and subcellular localization. Human MNK1b mRNA is almost identical to human MNK1 mRNA lacking the region corresponding to exon 12, which causes a change in the reading frame and generates a stop codon. The resulting protein lacks the last 89 amino acid residues at the C-terminal region which are replaced by 12 residues with an entirely new sequence, called MNK1b-specific region (MNK1bSR). MNK1b has a higher basal activity than MNK1a (O’Loghlen y col., 2007). The best-characterised MNK substrate is the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). In the cytoplasm, eIF4E is required for cap-dependent translation. eIF4E binds the 5’ cap structure of the eukaryotic cytoplasmic mRNAs and subsequently recruits the mRNA to the ribosome (Gingras y col., 1999). eIF4E is one of the components of the eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F), which consists of three subunits in higher eukaryotic: eIF4E, eIF4A, an ATP-dependent RNA helicase, and eIF4G. In order to phosphorylate efficiently eIF4E at serine 209, MNKs have to bind to the C-terminal region of eIF4G (Pyronnet y col., 1999). In the nucleus, eIF4E promotes the export of a subset of mRNAs, several of them involved in cancer progression. Other substrates for the MNKs, such as phospholipase A2 (Hefner y col., 2000), hnRNP A1 (Buxade y col., 2005), PSF (polypyrimidine tract-binding protein (PTB)-associated splicing factor) (Buxade y col., 2008a), and sprouty (DaSilva y col., 2006) have been also reported. Although some time ago it was suggested that eIF4G is a substrate for phosphorylation by the MNKs (Pyronnet y col., 1999), no further information has become available about the location of the phosphorylation sites or the functional significance of these modifications. Moreover, there is evidence that MNKs play a key role in the control of TNF α production and in the stress response,

probably through phosphorylation of hnRNP A1 that binds the regulatory AU-rich elements (AREs) of the 3'UTR of its mRNAs (Buxade y col., 2005).

eIF4E is often overexpressed in human cancers and associated with worse clinical outcome and decreased survival (De Benedetti y Graff, 2004). Several recent studies suggest that the increased phosphorylation of eIF4E at serine 209 may be a key factor in the tumoral progression (Fan y col., 2009). Breast cancer is one of the most challenging diseases, endangering the health of females worldwide, with the highest incidence found in developed countries. It is a complex disease that includes very different clinical, morphological and molecular entities. Breast tumors have been classified into 4 molecular subtypes: luminal A, luminal B, triple negative and HER2 enriched (Eroles y col., 2012; Perou y col., 2000; Sotiriou y col., 2003). A major challenge in breast cancer care is the identification of reliable biomarkers that improve early diagnosis, screening, prediction of outcome, therapeutic response, toxicity and identification of novel target therapies.

Aptamers are single-stranded oligonucleotides (ssDNA or RNA) that bind to targets with high affinity and selectivity. Based on their three-dimensional structures, aptamers can well-fittingly bind to a wide variety of targets from single molecules to complex target mixtures or whole organisms. Aptamers are selected by an in vitro method called systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). The use of aptamer as molecular recognition elements has emerged as a viable approach for biosensing, diagnostics and therapeutics (McKeague y Derosa, 2012). In some cases aptamers have the potential to inhibit the biological function of the target molecule resulting in useful reagents for target validation in a variety of disease models.

OBJECTIVES

The objectives proposed in this study are the following:

1. Characterize the molecular mechanisms implicated in MNK1b-mediated tumorigenic activity and determine the role of MNK1b as tumoral biomarker and therapeutic target in breast cancer.

2. Identify specific aptamers against MNK1b and characterize their potential as diagnostic and therapeutic tools.

RESULTS

Thirty-five samples from breast cancer and normal tissues, corresponding to luminal A (LA), luminal B (LB), triple negative (TN) and HER2 molecular subtypes, and three cell lines (MCF7, MDA-MB-231 and BT474), representing the major molecular subtypes of breast cancer (luminal A, triple negative and luminal B, respectively), were analysed in this study.

In the LA samples, the MNK1a levels were higher than in normal tissues samples, whereas in LB, TN and HER2, MNK1a levels were similar in both tissues. There is a parallelism between the results obtained with breast cancer tissues samples and cell lines, since MNK1a levels are high both in LA breast cancer tissues and MCF7 cells. In addition, there is an inverse correlation between MNK1b overexpression and HER2 overexpression although the causes are unknown.

eIF4E expression and eIF4E phosphorylation are significantly increased in breast cancer tissues samples compared to normal tissues. Analysing the molecular subtypes, eIF4E expression is increased in LA, LB and HER2 whereas this increment is not statistically significant in TN subtype. This result coincides with the lower eIF4E expression in MDA-MB-231 cells compared to the other cell lines. Furthermore, eIF4E

phosphorylation is increased in TN breast cancer tissues samples, which agrees with the results obtained using MCF7 and MDA-MB-231 cells. Interestingly, there is not a parallelism between eIF4EP and MNK1a/b expression either in the cell lines or the breast cancer tissues samples.

The study of the different phosphorylation pathways shows that MAPK pathway is much activated in MCF7 cells, both MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways are activated in MDA-MB-231 cells, and PI3K/AKT/mTOR pathway is activated in BT474 cells. Interestingly, MDA-MB-231 cells show higher cell proliferation and clonogenic activity than MCF7 and BT474 cells.

SB203580, a p38 inhibitor, reduces MTT activity in MCF7 and BT474 cells but it does not affect MDA-MB-231 cells. The decrease in MTT activity seems not to be mediated by eIF4E phosphorylation. U0126, a MEK inhibitor, reduces MTT activity and eIF4E phosphorylation in MCF7, MDA-MB-231 and BT474 cells. CGP57380, a MNK inhibitor, decreases eIF4E phosphorylation in the three breast cancer cell lines and MTT activity and colony forming capacity in MCF7 and MDA-MB-231, whereas it does not affect BT474 cells.

We have identified apMNK2F, apMNK3R and apMNK4R aptamers which recognize both MNK1 isoforms. These aptamers reduce MTT activity and colony forming capacity in MDA-MB-231 cells and have an antiproliferative effect. However, eIF4E phosphorylation is not affected by these aptamers.

CONCLUSIONS

1. MNK1b can be considered a negative HER2 biomarker since there is an inverse correlation between MNK1b overexpression and HER2 overexpression in breast tumors. The increase in MNK1b expression could be caused by alterations in regulatory proteins and/or mRNA mutations that stimulate alternative splicing.

2. There is not a correlation between eIF4E global phosphorylation and MNK1b expression in tumour cells. Nevertheless, we cannot discard the role of MNK1b in differential eIF4E phosphorylation in distinct cellular compartments or in other unknown substrates phosphorylation.

3. The pathway PI3K/AKT/mTOR/4E-BP1, that regulates eIF4E availability through 4E-BP1 phosphorylation, seems to be responsible for high eIF4E phosphorylation in BT474 cells, which have inhibited the MAPK pathway. In this case, the kinases that phosphorylate eIF4E would be MNK1b and/or MNK2 whose phosphorylation is independent of MAPK.

4. apMNK2F and apMNK3R aptamers can be considered good candidates to be used in breast cancer diagnostic systems. Although these aptamers bind both MNK1 isoforms, they bind MNK1b with more affinity. This is due to the fact that aptamers bind to the kinase in the region located between the last amino acids common to both isoforms and the specific region of MNK1b (MNK1bSR).

5. In the future, the apMNK2F, apMNK3R and apMNK4R aptamers could be used in the development of therapeutic systems, as they can reduce proliferation and clonogenic activity in breast cancer cells.

